

Université de Sherbrooke

L'implication de la signalisation des Bmps dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale et colique et dans les pathologies digestives.

Par
Joannie Allaire
Programme de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
Pour l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2016

Membres du jury d'évaluation
Pre Nathalie Perreault, Programme de Biologie Cellulaire
Pre Claire Dubois, Programme de Biologie Cellulaire
Pr Mannix Auger-Messier, Département de Médecine
Pre Marie-Pier Tétreault, Department of Medicine, Northwestern University

© Joannie Allaire, 2016

À mon mari et mon fils pour leur soutien et leur amour.

À mes proches qui auraient ou qui nécessitent toujours une meilleure compréhension du système digestif et de ces pathologies afin de bénéficier d'une meilleure qualité de vie...

The scariest moment is always the one just before you start...
Stephen King

RÉSUMÉ

L'implication de la signalisation des Bmps dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale et colique et dans les pathologies digestives.

Par

Joannie Allaire

Programme de Biologie Cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les Bmps sont des morphogènes jouant des rôles dans l'embryogenèse et l'organogenèse du tube digestif. Les BR-Smads, Smad1, Smad5 et Smad8, sont les effecteurs intracellulaires de cette cascade de signalisation et ils assurent la biodiversité des réponses biologiques associées aux Bmps. Plusieurs études ont démontrées des rôles importants pour le TGF- β dans le cancer colorectal et l'inflammation intestinale. Cependant, très peu d'études se sont attardées aux rôles pouvant être joués par d'autres membres de la superfamille du TGF- β dans ces pathologies. Dans cette étude, le modèle de souris possédant la délétion de Smad5 strictement à l'épithélium a permis de démontrer le rôle spécifique de cet effecteur dans les diverses actions associées à la signalisation des Bmps dans ce compartiment cellulaire. La perte conditionnelle de Smad5 cause un allongement villositaire, une hyper migration et une relocalisation cytoplasmique de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales. Cette étude permet de démontrer l'importance de la signalisation des Bmps dans les maladies inflammatoires intestinales, puisque les défauts occasionnés par la perte de Smad5 au niveau de l'épithélium entraînent une plus grande susceptibilité à l'inflammation intestinale et des défauts importants dans la réparation la barrière épithéliale.

Des mutations causant l'inhibition de la signalisation des Bmps sont fréquemment retrouvées chez des patients atteints du syndrome de JPS possédant un risque élevé de développer le cancer colorectal. Des études ont démontré l'implication des Bmps dans le maintien de l'homéostasie et l'initiation de la polypose intestinale, sans toutefois discriminer le mécanisme et le type cellulaire responsable de l'induction de ce phénotype. Les études antérieures du laboratoire ont permis de démontrer que la perte des Bmps strictement épithéliale était insuffisante pour initier la polypose colique, suggérant une implication de cette signalisation au niveau des cellules extra-épithéliales. Le modèle murin ayant la délétion du récepteur *Bmpr1a* dans le mésenchyme seulement a permis de mettre en évidence un rôle essentiel de cette signalisation dans le contrôle du microenvironnement entourant les cellules épithéliales et l'induction de la polypose colique. Le modèle cellulaire a révélé un profil transcriptionnel s'apparentant à celui retrouvé dans le microenvironnement des tumeurs de cancer colorectal. Cette étude démontre que la signalisation des Bmps mésenchymateuse est primordiale pour contrôler l'homéostasie intestinale et l'initiation de la polypose.

Mots clés : Bmps, inflammation intestinale, épithélium, barrière intestinale, cancer colorectal, mésenchyme, microenvironnement.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------------|
| Résumé | iv |
| Table des matières..... | v |
| Liste des figures..... | ix |
| Liste des tableaux..... | xi |
| Liste des abréviations..... | xii |
| 1. Introduction..... | 14 |
| 1.1 La muqueuse intestinale et colique : leurs différences et leurs particularités | 14 |
| 1.1.1 <i>La muqueuse intestinale.....</i> | 14 |
| 1.1.2 <i>La muqueuse colique.....</i> | 16 |
| 1.2 Les cellules épithéliales..... | 17 |
| 1.2.1 <i>Le renouvellement des cellules épithéliales.....</i> | 17 |
| 1.2.2 <i>Les types de cellules épithéliales différenciées.....</i> | 20 |
| 1.2.3 <i>Les jonctions cellulaires</i> | 22 |
| 1.3 Les cellules mésenchymateuses | 25 |
| 1.3.1 <i>Les types de cellules mésenchymateuses</i> | 25 |
| 1.3.2 <i>Leur rôle dans le développement et l'homéostasie intestinale</i> | 27 |
| 1.4 Les cellules immunitaires | 32 |
| 1.5 Les pathologies de l'intestin et du côlon | 34 |
| 1.5.1 <i>Les maladies inflammatoires de l'intestin</i> | 34 |
| 1.5.2 <i>Le cancer colorectal</i> | 38 |
| 1.5.3 <i>Les syndromes de polypose</i> | 45 |
| 1.6 La signalisation des Bmps..... | 47 |
| 1.6.1 <i>La signalisation des Bmps de l'intestin et du côlon</i> | 47 |
| 1.6.2 <i>Les études antérieures de la signalisation des Bmps dans l'intestin.....</i> | 50 |
| 1.6.3 <i>La signalisation des Bmps dans les pathologies intestinales.....</i> | 53 |
| 1.7 Hypothèse et objectifs du volet 1 : Smad5 épithélial | 56 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.8 | Hypothèse et objectifs du volet 2 : Bmpr1a mésenchyme | 57 |
| 1.9 | Hypothèse et objectif du volet 3 : Modèle in vitro pour Bmpr1a mésenchyme.. | 58 |
| 2. | Matériel et méthodes | 59 |
| 2.1 | Procédures impliquant des animaux..... | 59 |
| 2.2 | Génotypage des animaux | 60 |
| 2.3 | Induction d'une colite chimique | 61 |
| 2.4 | Évaluation des signes cliniques de la colite | 62 |
| 2.5 | Incorporation au 5-bromo-2'-déoxyuridine | 63 |
| 2.6 | Euthanasie des souris..... | 63 |
| 2.7 | Évaluation macroscopique des tissus..... | 63 |
| 2.8 | MatriSperse : dissociation de l'épithélium et du mésenchyme | 64 |
| 2.9 | Extraction d'ADN génomique sur colonne et validation de la recombinaison | 64 |
| 2.10 | Fixation des tissus | 65 |
| 2.11 | Microscopie électronique..... | 65 |
| 2.12 | Circulation et coupes histologiques..... | 66 |
| 2.13 | Inclusion et coupe en O.C.T..... | 66 |
| 2.14 | Immunofluorescence sur les coupes en paraffine | 67 |
| 2.15 | Coloration à l'Hématoxyline et Éosine | 69 |
| 2.16 | Coloration à l'alcan bleu | 70 |
| 2.17 | Coloration Trichrome de Masson | 70 |
| 2.18 | Immunohistochimie sur les coupes histologiques | 71 |
| 2.19 | Score histologique de la colite | 72 |
| 2.20 | Essai TUNEL | 73 |
| 2.21 | Immunofluorescence sur les coupes en O.C.T..... | 73 |
| 2.22 | Extraction de protéines | 75 |
| 2.23 | Dosage protéique | 75 |
| 2.24 | Immunobuvardage de type Western Blot..... | 75 |
| 2.25 | Extraction des ARN | 77 |
| 2.26 | DNase et transcription inverse | 79 |
| 2.27 | PCR quantitatif..... | 79 |
| 2.28 | Analyses statistiques | 83 |
| 2.29 | Culture cellulaire | 83 |
| 2.30 | Production et infection lentivirale..... | 84 |

| | |
|--|------------|
| 2.31 Traitement au LDN193189 | 84 |
| 2.32 Extraction de protéines des cellules en culture | 84 |
| 2.33 Extraction d'ARN sur colonne | 85 |
| 2.34 Micropuce à ADN | 85 |
| 3. RÉSULTATS..... | 86 |
| 3.1 Volet 1 : Smad5 et la régulation de la barrière intestinale et de l'inflammation.. | 86 |
| 3.1.1 <i>Génotypage des souris Smad5^{ACE1}</i> | 86 |
| 3.1.2 <i>Validation de la perte d'expression de Smad5.....</i> | 87 |
| 3.1.3 <i>Effet de la perte de Smad5 sur l'architecture de l'axe crypte-villosité.....</i> | 88 |
| 3.1.4 <i>Effet de la perte de Smad5 sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules épithéliales</i> | 90 |
| 3.1.5 <i>Effet de la perte de Smad5 sur la régulation du maintien du complexe apical de jonctions.....</i> | 93 |
| 3.1.6 <i>Effet de la perte de Smad5 sur des protéines de la réorganisation du cytosquelette</i> | 97 |
| 3.1.7 <i>Implication des éléments de la signalisation des Bmps dans les maladies inflammatoires</i> | 99 |
| 3.1.8 <i>Effet de la perte de Smad5 sur la susceptibilité à la colite chimique.....</i> | 103 |
| 3.2 Volet 2 : La signalisation mésenchymateuse des Bmps et la régulation du microenvironnement et de la polypose | 107 |
| 3.2.1 <i>Génotypage des souris Bmpr1a^{ΔMes}</i> | 107 |
| 3.2.2 <i>Validation de la perte d'expression de Bmpr1a dans les myofibroblastes</i> | 108 |
| 3.2.3 <i>Observations macroscopiques des souris Bmpr1a^{ΔMes}</i> | 110 |
| 3.2.4 <i>Effet de la perte de Bmpr1a mésenchymateuse sur l'architecture du côlon</i> | 111 |
| 3.2.5 <i>Effet de la perte de Bmpr1a mésenchymateuse sur la prolifération et l'apoptose.</i> | 112 |
| 3.2.6 <i>Effet de la perte de Bmpr1a mésenchymateuse sur l'élargissement du compartiment mésenchymateux.</i> | 115 |
| 3.2.7 <i>Effet de la perte de Bmpr1a mésenchymateuse sur le remodelage de la matrice extracellulaire.....</i> | 119 |
| 3.2.8 <i>La perte de Bmpr1a mésenchymateuse entraine une infiltration de cellules immunitaires.....</i> | 123 |
| 3.2.9 <i>La perte de Bmpr1a mésenchymateuse entraine une dérégulation du microenvironnement.....</i> | 128 |

| | |
|---|------------|
| 3.3 Volet 3 : La signalisation myofibroblastique des Bmps régule des éléments importants du microenvironnement..... | 131 |
| 3.3.1 Validation de l'efficacité des <i>shBmpr1a</i> dans les 18Co..... | 131 |
| 3.3.2 Validation du traitement au LDN193189 sur les 18Co..... | 133 |
| 3.3.3 Analyse en micropuce d'ADN du profil transcriptionnel des 18Co..... | 134 |
| 4. DISCUSSION..... | 141 |
| 4.1 Volet 1 : Smad5 et la régulation de la barrière intestinale et l'inflammation..... | 141 |
| 4.1.1 Smad5 et le contrôle de la prolifération et la migration des cellules épithéliales .. | 141 |
| 4.1.2 Smad5 et le contrôle des protéines de jonctions..... | 143 |
| 4.1.3 Smad5 et son implication dans les maladies inflammatoires intestinales..... | 147 |
| 4.1.4 Volet 1 : Conclusions et perspectives..... | 151 |
| 4.2 Volet 2 : La signalisation mésenchymateuse des Bmps et la régulation du microenvironnement et de la polypose | 153 |
| 4.2.1 La signalisation mésenchymateuse des Bmps et la muqueuse colique..... | 154 |
| 4.2.2 La signalisation des Bmps et le myofibroblaste..... | 160 |
| 4.2.3 La signalisation des Bmps mésenchymateuse et le microenvironnement..... | 162 |
| 4.2.4 Volet 2 : Conclusions et perspectives..... | 164 |
| 4.3 Volet 3 : La signalisation des Bmps dans le myofibroblaste | 168 |
| 4.3.1 La signalisation des Bmps dans le myofibroblaste | 168 |
| 4.3.2 Les modulations des facteurs de croissance..... | 170 |
| 4.3.3 Les modulations des cytokines, chimiokines et des éléments de la matrice extra-cellulaire | 172 |
| 4.3.4 Volet 3: Conclusions et perspectives..... | 174 |
| REMERCIEMENTS | 177 |
| Liste des références..... | 180 |
| Annexes | 193 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Représentation de la muqueuse de l'intestin | 16 |
| Figure 2 : Représentation de la muqueuse colique | 17 |
| Figure 3: Schématisation de la signalisation des Bmps | 48 |
| Figure 4. Détermination du génotype de la lignée de souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 87 |
| Figure 5. Validation de la perte d'expression de <i>Smad5</i> au niveau de l'épithélium intestinal. | 88 |
| Figure 6. Impact de la délétion de <i>Smad5</i> sur l'architecture de l'axe crypte-villosité. | 89 |
| Figure 7. Analyse de la prolifération chez les souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 90 |
| Figure 8. Analyse de la migration épithéliale chez les souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 92 |
| Figure 9. Analyse de l'apoptose chez les souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 93 |
| Figure 10. Impact sur l'apparence structurelle du complexe apical de jonctions..... | 94 |
| Figure 11. Localisation des protéines composant les jonctions serrées..... | 95 |
| Figure 12. Localisation des protéines composant les jonctions adhérentes..... | 96 |
| Figure 13. Expression des protéines composant le complexe apical de jonctions chez les souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 97 |
| Figure 14. Expression de l'état de phosphorylation de la Cofiline dans les souris <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 99 |
| Figure 15. Expression des composants de la signalisation des Bmps chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales..... | 100 |
| Figure 16. Expression des composants de la signalisation des Bmps dans un modèle murin de colite chimique..... | 101 |
| Figure 17. Expression de l'état de phosphorylation de <i>Smad5</i> pendant une colite chimique. | 102 |
| Figure 18. Susceptibilité à la colite chimique des souris contrôles et <i>Smad5</i> ^{ΔCEI} | 103 |
| Figure 19. La perte épithéliale de <i>Smad5</i> augmente les signes histologiques à la colite chimique. | 104 |
| Figure 20. La perte épithéliale de <i>Smad5</i> entraîne des défauts de réparation à la suite de la colite chimique..... | 106 |
| Figure 21. Détermination du génotype de la lignée de souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} | 107 |

| | |
|--|-----|
| Figure 22. Validation de la perte d'expression de <i>Bmpr1a</i> au niveau du mésenchyme colique..... | 109 |
| Figure 23. Apparition de prolapsus rectaux et de polypes dans la muqueuse colique des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} de 1 an. | 110 |
| Figure 24. Impact de la délétion de <i>Bmpr1a</i> sur l'architecture des glandes coliques..... | 112 |
| Figure 25. Analyse de la prolifération chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} | 114 |
| Figure 26. Analyse de l'apoptose chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} | 115 |
| Figure 27. Localisation des différents types de cellules mésenchymateuses. | 117 |
| Figure 28. Activation de la signalisation des Bmps dans les cellules mésenchymateuses. | 119 |
| Figure 29. Visualisation de la déposition de collagène I. | 120 |
| Figure 30. Visualisation de la déposition de collagène IV. | 121 |
| Figure 31. Visualisation de la déposition de fibronectine. | 122 |
| Figure 32. Expression des protéines du mésenchyme chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} | 123 |
| Figure 33. Localisation de cellules immunitaires de type macrophage..... | 124 |
| Figure 34. Localisation de cellules immunitaires de types neutrophiles. | 125 |
| Figure 35. Localisation de cellules immunitaires de type lymphocyte T. | 126 |
| Figure 36. Localisation de cellules immunitaires de types lymphocytes B..... | 128 |
| Figure 37. Validation de la lignée cellulaire 18Co ^{shBmpr1a} | 132 |
| Figure 38. Validation du traitement au LDN193189 1uM sur les 18Co. | 134 |
| Figure 39. Diagramme de Venn représentant le profil transcriptionnel des 18Co ^{shBmpr1a} vs 18Co ^{LDN193189} | 135 |
| Figure 40. Séquence d'évènement dans la muqueuse à la suite de la perte de la signalisation mésenchymateuse des Bmps..... | 155 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Croisements des lignées de souris..... | 60 |
| Tableau 2. Amorces utilisées pour le géotypage par PCR..... | 61 |
| Tableau 3. Évaluation des signes cliniques de la colite..... | 62 |
| Tableau 4. Étape de circulation des tissus | 66 |
| Tableau 5. Conditions des anticorps utilisés en immunofluorescence | 68 |
| Tableau 6. Score histologique de la colite | 72 |
| Tableau 7. Conditions des anticorps utilisés en immunofluorescence-OCT..... | 74 |
| Tableau 8. Conditions des anticorps utilisés en Western Blot..... | 77 |
| Tableau 9. Amorces utilisées en qPCR..... | 80 |
| Tableau 10. Niveau d'expression des facteurs solubles et non-solubles associés à la composition du microenvironnement des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔMES} | 130 |
| Tableau 11. Liste des maladies et fonctions prédites à être modulées | 136 |
| Tableau 12. Liste des gènes modulés appartenant à la superfamille du TGFβ..... | 137 |
| Tableau 13. Liste des gènes modulés associés aux facteurs de croissance..... | 138 |
| Tableau 14. Liste de gènes modulés associés à la composition de la matrice extracellulaire | 139 |
| Tableau 15. Liste des gènes modulés associés aux cytokines et chimiokines..... | 139 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNc | ARN complémentaire |
| ARNm | ARN messenger |
| APC | <i>Adenoma Polyposis Coli</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| Arp | <i>Actin Related-Protein</i> |
| Bmp | <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| BMPR1A | <i>Bone morphogenetic protein receptor 1 A</i> |
| BrdU | BromodéoxyUridine |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CBC | <i>Crypt-Based Columnar</i> |
| CCL | <i>Chemokine CC motif Ligand</i> |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CXCL | Chemokine CXC motif Ligand |
| CSPG | <i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan</i> |
| DAI | Disease Activity Index |
| Dkk | Dickkopf |
| dNTP | Désoxyribonucléotide triphosphate |
| Dpp | Decapentaplegic |
| DSS | Dextran Sulfate Sodium |
| EDTA | Ethylène Diamine Tétra-Acétique |
| EGF | Epithelial Growth Factor |
| EMEM | <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> |
| ENG | Endogline |
| FAP | Familial Adenoma Polyposis |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| Fox | Forkhead box |
| Gab1 | Growth Factor receptor-boud protein2 associated binding protein |
| Grb | Growth Factor receptor-boud protein2 |
| GALT | Gut-Associated Lymphoid Tissue |
| GIP | Gastric Inhibitory Peptide |
| GSK3 β | Glycogène-Synthase Kinase 3 β |
| HEPES | 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid |
| Hh | HedgeHog |
| HNF4 | Hepatocyte nuclear factor 4 |
| HNPCC | Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer |
| ID | <i>Inhibitory of DNA binding</i> |
| Ig | Immunoglobuline |
| Ihh | Indian hedgehog |
| IL | Interleukine |
| IFN | Interféron |
| JAM | <i>Junctional Adhesion Molecule</i> |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |

| | |
|--------------|--|
| JPS | Juvenile Polyposis Syndrome |
| LEF | Lymphoid Enhancer-binding Factor |
| LIMK | Lim Kinase |
| LRC | Label retaining cell |
| MMPs | Matrix Metalloproteinases |
| MPO | Myeloperoxidase |
| Nb | Nombre |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCNA | Proliferating Cells Nuclear Antigen |
| PCP | Planar Cell Polarity |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PHTS | PTEN Hamartoma Tumor Syndrome |
| PJS | Peutz-Jegher Syndrome |
| PTEN | Phosphatase and Tensin Homologue |
| ROCK | Rho-associated protein Kinase |
| SDF-1 | Stromal-derived factor 1 |
| SEM | Standard error median |
| SFRP1 | Secreted Frizzled-related protein 1 |
| Shh | Sonic Hedghog |
| α SMA | Alpha Smooth Muscle Actin |
| SMAD | Sma and Mothers Against Decapentaplegic homolog |
| SSH | Slingshot |
| STK11 | Sérine-thréonine kinase 11 |
| T°app | Température d'appariement |
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| THBS | Thrombospondin |
| TUNEL | Terminal déoxynucloétyl transferase dUTP Nick End Labeling |
| WNT | Wingless |
| ZO | Zonula Occludens |

1. INTRODUCTION

Le tube digestif est un organe complexe et dynamique. Il se segmente en plusieurs régions formant dans l'ordre l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et l'anus. La digestion des aliments débute dans la bouche et l'estomac pour s'effectuer par la suite principalement dans l'intestin grêle, endroit où la majorité de l'absorption des nutriments se réalise. L'intestin grêle est subdivisé en trois parties distinctes, à savoir le duodénum, le jéjunum, et l'iléon. Le côlon, étant la partie la plus distale du tube digestif, est le principal lieu d'absorption de l'eau. La muqueuse intestinale et colique est repliée afin d'augmenter grandement la surface de contact ainsi que pour favoriser une meilleure digestion et absorption des nutriments. Étant relié directement à la bouche, le tube digestif est directement connecté à notre environnement extérieur. Il possède donc un système immunitaire particulier permettant une interaction constante entre les différents nutriments et les bactéries retrouvées dans la lumière intestinale. La muqueuse digestive est le premier endroit de contact avec les antigènes exogènes et elle est composée de différents types cellulaires spécialisés selon les régions du tube digestif. Ces cellules spécialisées permettent à la muqueuse d'assurer les fonctions principales de chacun des segments du tube digestif. Étant si primordiale dans le fonctionnement du tube digestif, elle est le lieu principal du développement d'une grande partie des pathologies digestives.

1.1 La muqueuse intestinale et colique : leurs différences et leurs particularités

1.1.1 La muqueuse intestinale

L'intestin grêle est segmenté en trois parties selon l'axe rostro-caudal, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La structure de la paroi intestinale est divisée en quatre couches : soit la séreuse, la musculieuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. La muqueuse couvre la surface intérieure du tube et elle est repliée en forme d'axe crypte-villosité assurant l'énorme surface de contact (Figure 1). Cette muqueuse assure les quatre fonctions principales de l'intestin, soit celle de barrière contre le contenu de la lumière, celle de sécrétion d'hormones et de facteurs de croissance, celle d'absorption

et de transport des nutriments, ainsi que celle immunitaire (Turner, J R, 2009). Au niveau de la muqueuse, on retrouve différents types cellulaires comme les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses, les cellules musculaires et les cellules immunitaires (Rao et Wang, 2010). Les cellules épithéliales sont les premières cellules en contact avec l'environnement luminal. La muqueuse intestinale est le principal lieu de digestion et d'absorption des différents nutriments. Parmi les particularités de l'intestin grêle, on retrouve son architecture en forme d'axe crypte-villosité qui est très caractéristique à ce tissu. De plus, on y retrouve la présence d'un type cellulaire spécifique soit les cellules de Paneth qu'on ne retrouve pas dans le côlon ni l'estomac (van der Flier et Clevers, 2009). Les différents types de cellules épithéliales seront décrits plus loin. L'axe crypte-villosité permet non seulement l'organisation architecturale de l'épithélium intestinal, mais également son organisation séquentielle. Les cellules souches, les cellules prolifératrices et les cellules en voie de différenciation se retrouvent dans les cryptes, alors que les cellules pleinement différenciées migrent le long de la villosité pour être extrudées à l'apex. La migration des cellules épithéliales, de la base de la crypte à l'apex de la villosité, prend entre trois et cinq jours. Une autre particularité de l'intestin grêle est la localisation des cellules pleinement différenciées, les cellules de Paneth, à la base des cryptes. Ces cellules ont la capacité d'entamer une migration descendante, vers la base des cryptes (van der Flier et Clevers, 2009).

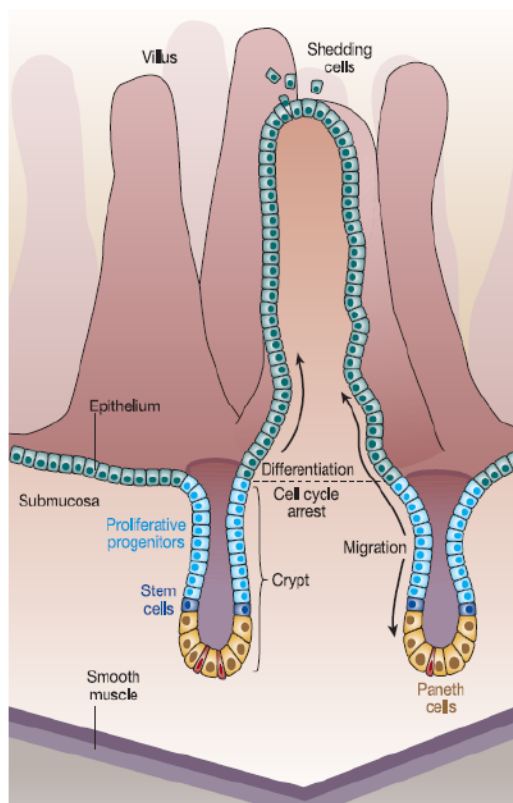


Figure 1 : Représentation de la muqueuse de l'intestin

Dans l'intestin grêle, l'épithélium est organisé en axe crypte-villosité. La crypte contient les cellules souches, les cellules progénitrices et les cellules de Paneth. La division asymétrique des cellules souches donne naissance à une nouvelle cellule souche et une cellule progénitrice. La cellule progénitrice va entamer un processus de différenciation en migrant vers le haut de la crypte pour donner quatre types de cellules différenciées qui migreront jusqu'à l'apex de la villosité. Tiré de Reya et Clevers 2005. License # 3760830600326.

1.1.2 La muqueuse colique

La particularité différenciant la muqueuse colique de la muqueuse intestinale est principalement l'absence de villosité dans le côlon. La muqueuse du côlon est formée de glandes profondes et d'un épithélium de surface (Figure 2). Cette muqueuse sert principalement de lieu d'absorption de l'eau et des sels afin de permettre aux résidus non digérés de former les selles. De façon similaire à l'intestin, les cellules souches se retrouvent à la base des glandes pour se diviser et permettre aux cellules progénitrices de proliférer et se différencier tout en migrant jusqu'à l'épithélium de surface. Comme

il a été mentionné plus haut, les cellules de Paneth sont absentes du côlon. Les cellules caliciformes y sont toutefois plus nombreuses comparativement à l'intestin grêle (van der Flier et Clevers, 2009).

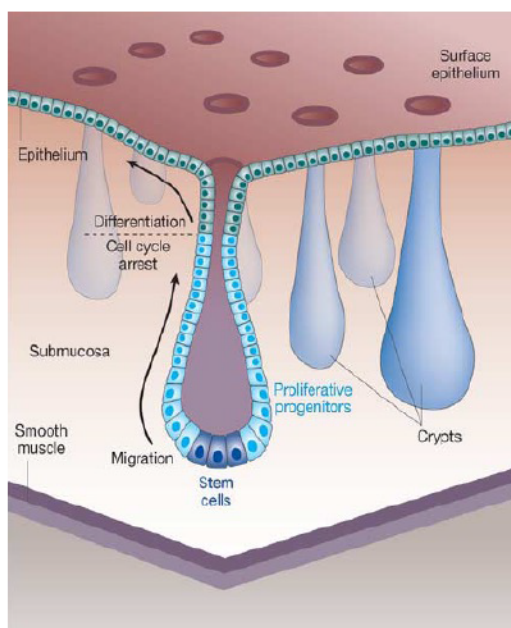


Figure 2 : Représentation de la muqueuse colique

L'épithélium colique est organisé en cryptes profondes dépourvues de villosité. La base de la crypte contient les cellules souches et les cellules progénitrices. La division asymétrique des cellules souches donne naissance à une nouvelle cellule souche et une cellule progénitrice. La cellule progénitrice va entamer un processus de différenciation en migrant vers le haut de la crypte pour donner trois types de cellules différenciées qui migreront jusqu'à former l'épithélium de surface. Tiré de Reya et Clevers 2005. License # 3760830600326.

1.2 Les cellules épithéliales

1.2.1 Le renouvellement des cellules épithéliales

Le renouvellement constant de l'épithélium intestinal est assuré par une prolifération maintenue associée à une exfoliation des cellules épithéliales à l'apex des villosités. Le renouvellement et la prolifération des cellules épithéliales sont assurés par la présence de cellules souches situées à la base des cryptes. On retrouve deux types de cellules souches dans l'intestin grêle et le côlon, soit les cellules souches CBC (*Crypt-Based-Columnar*) et les cellules souches LRC (*Label Retaining Cell*). Les cellules souches LRC se retrouvent à la position +4 en partant du fond de la crypte, les

localisant donc juste au-dessus des cellules de Paneth. Ces cellules occupent un rôle de soutien en cas de dysfonctionnement ou d'insuffisance des cellules CBC et elles expriment des marqueurs uniques dont *Bmi1* et *Lrg1* (Barker, 2014; Haegebarth et Clevers, 2009). Les cellules CBC, exprimant des marqueurs spécifiques comme *Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl1*, se retrouvent à la base de la crypte, intercalées entre les cellules de Paneth (Barker, 2014). Les cellules CBC, pour leur part, assurent le renouvellement de l'intestin en effectuant des divisions asymétriques pour produire une cellule progénitrice et une cellule souche (Haegebarth et Clevers, 2009). Les cellules souches sont des cellules pluripotentes qui ont une durée de vie très longue comparativement aux autres types cellulaires. Les cellules progénitrices provenant de la division des cellules souches ont aussi une capacité proliférative pour générer d'autres cellules progénitrices. Tout en migrant le long de la crypte, les cellules progénitrices prolifératives vont se diviser rapidement afin d'augmenter le nombre de cellules épithéliales provenant de la même cellule souche. Dans le tiers supérieur de la crypte, ces cellules épithéliales reçoivent des signaux qui leur indiqueront d'entamer leur différenciation (Crosnier *et al.*, 2006).

Depuis l'identification des cellules souches intestinales, plusieurs voies de signalisation sont maintenant connues pour maintenir le compartiment cryptal, ainsi que pour supporter la prolifération et conserver la niche de la cellule souche à la base des cryptes. Une des principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération est la voie de Wnt/ β -caténine. En absence des ligands Wnt, la β -caténine est séquestrée au cytoplasme par un complexe comprenant les protéines GSK3 β (*Glycogen-Synthase Kinase-3 β*), APC (*Adenoma Polyposis Coli*) et l'axine. Ce complexe de séquestration permet la phosphorylation de la β -caténine pour assurer sa dégradation par le protéasome. Lors de la liaison des Wnt à leurs récepteurs Frizzled/LRP6, il y a désassemblage du complexe de séquestration et la β -caténine est libérée et accumulée dans le cytoplasme. La β -caténine accumulée peut transloquer au noyau et s'associer aux facteurs de transcription LEF/TCF4 permettant la régulation de gènes cibles tels que cycline et c-Myc (Giles *et al.*, 2003; Sansom *et al.*, 2007). Cette voie de signalisation est d'autant plus connue pour être une des premières où des

mutations sont observées dans les cellules épithéliales intestinales lors du développement du cancer colorectal (Haegebarth et Clevers, 2009).

La niche des cellules souches est maintenue par différents gradients d'expression de facteurs qui sont, entre autres, produits par les cellules mésenchymateuses. Au sein de la crypte, on retrouve un gradient d'expression des Wnts qui est décroissant en montant vers la partie supérieure de la crypte. Il existe aussi des gradients d'expression pour différents morphogènes essentiels à l'homéostasie intestinale, comme les Bmps et les Hedgehog. Un morphogène est une molécule retrouvée en gradient de concentrations variées au sein d'un même tissu. Les morphogènes sont donc capables de produire différents effets sur le même type cellulaire dépendamment de leur concentration extracellulaire. Les Bmps (*Bone Morphogenetic Protein*) sont un exemple de morphogènes qui possèdent un gradient d'expression décroissant du haut de la villosité vers le bas de la crypte (Haramis *et al.*, 2004). En fait, ce gradient d'expression est maintenu grâce à l'action de Noggin, un antagoniste extracellulaire des Bmps fortement exprimé à la base des cryptes pour inhiber cette signalisation assurant le maintien de la prolifération au niveau des cellules souches et cellules progénitrices. Ayant une concentration d'expression grandissante de la partie supérieure des cryptes vers la villosité, les Bmps inhibent la prolifération afin de permettre aux cellules épithéliales d'entamer leur différenciation. Ces morphogènes seront discutés plus en détails dans la section 1.6.

Une autre famille de morphogènes importants, dans le développement et le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale et colique, est la famille des Hedgehog (Hh). Leur gradient d'expression pour un des ligands, Indian Hedgehog (Ihh), est similaire à celui des Bmps puisqu'on retrouve une plus grande expression vers le haut de la villosité. Sonic Hedgehog (Shh), un autre ligand de la famille des Hh, semble être exprimé principalement à la base des cryptes, dans la région des cellules souches (van den Brink, 2007). Les ligands sécrétés par les cellules épithéliales intestinales interagissent directement de façon paracrine sur les cellules mésenchymateuses ou

autocrine sur les cellules épithéliales. Cette signalisation a été démontrée comme très importante pour le contrôle de la prolifération des cellules souches et aussi pour la différenciation de l'épithélium (Gagne-Sansfacon *et al.*, 2014; van den Brink, 2007).

1.2.2 Les types de cellules épithéliales différenciées

L'épithélium intestinal est formé grâce à la division de cellules souches résidant à la base des cryptes. Ces cellules progénitrices vont proliférer et se différencient dans le tiers supérieur de la crypte pour finalement migrer dans la villosité (van der Flier et Clevers, 2009). Il a été précédemment présenté que la prolifération cellulaire et le maintien de la niche des cellules souches sont coordonnés par différents mécanismes de régulation au niveau de la muqueuse intestinale. Cette muqueuse doit aussi réguler la différenciation, un processus assurant la destinée de chacune des cellules filles. Pour ce faire, les cellules épithéliales, en voie de différenciation, nécessitent des signaux spécifiques pour engager des voies de signalisation essentielles au devenir de chacun des types de cellules épithéliales différenciées retrouvées dans l'intestin. La voie de Notch est l'une des principales voies impliquées dans la différenciation de cellules épithéliales. Cette voie contrôle la destinée de ces cellules puisqu'elle assure la décision entre les deux lignées distinctes de cellules épithéliales différenciées, à savoir la lignée sécrétrice et la lignée absorbante. La signalisation de Notch s'effectue lorsqu'il y a la liaison du ligand Delta, exprimé par une cellule, au récepteur Notch présent sur la cellule voisine. Ceci engagera une signalisation intracellulaire dans la cellule possédant le récepteur Notch qui permettra l'expression du facteur de transcription Hes1 et dirigera la différenciation cellulaire vers le phénotype absorbant (Shroyer *et al.*, 2005). Hes1 va réprimer le gène *Math1* responsable d'induire la lignée sécrétrice. La cellule voisine qui exprimait le ligand Delta et dont aucune signalisation n'a été engagée va maintenir l'expression de *Math1* et se différencier en cellule de la lignée sécrétrice. Par la suite, d'autres voies de signalisation vont poursuivre l'induction de la différenciation terminale pour obtenir chacun des types cellulaires de l'épithélium intestinal (Crosnier *et al.*, 2006; van der Flier et Clevers, 2009).

De façon générale, il existe quatre principaux types de cellules épithéliales différenciées qui se divisent en deux lignées précédemment mentionnées, soit la lignée absorbante comprenant les entérocytes et la lignée sécrétrice comprenant les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (van der Flier et Clevers, 2009). En plus de ces quatre types principaux, certains sous-types de cellules épithéliales différenciées peuvent être retrouvées de façon minoritaire dans l'intestin et le côlon. Ces types de cellules épithéliales intestinales sont moins bien connus et caractérisés. On retrouve les cellules M (Miller *et al.*, 2007), les cellules « *Cup* » (Madara et Carlson, 1985) et les cellules « *Tuft* » (Gerbe *et al.*, 2012).

Les entérocytes sont des cellules très présentes dans le tube digestif. Elles sont le seul type de cellules absorbantes et elles représentent près de 80% des cellules différenciées. Ce sont des cellules polarisées qui possèdent, au niveau apical, des microvillosités formant une bordure en brosse. Au niveau de l'intestin, la bordure en brosse va contenir plusieurs enzymes digestives et transporteurs importants pour la digestion et l'absorption des nutriments (van der Flier et Clevers, 2009). Dans ces protéines de la bordure en brosse, on retrouve, entre autres, la sucras-isomaltase et l'iFABP (intestinal fatty acid binding protein) qui sont utilisées pour visualiser les entérocytes. Dans le côlon, cette bordure en brosse est présente, mais moins bien définie. Elle va comporter des transporteurs essentiels pour l'absorption de l'eau et des sels (Benga, 2009).

La deuxième catégorie de cellules épithéliales différenciées est la lignée des cellules sécrétrices. On retrouve d'abord les cellules entéroendocrines qui représentent seulement 1% des cellules de l'épithélium intestinal, mais elles constituent l'organe endocrinien le plus imposant du corps humain. Il existe au moins 10 différents types de cellules entéroendocrines et qui sont classifiées principalement par le type d'hormones sécrétées. Ces cellules épithéliales différenciées sont responsables de la sécrétion de plusieurs hormones dont : la ghréline, la cholécystokinine, le peptide insulinothypique dépendant du glucose (GIP), la sécrétine, le glucagon-like peptide, la sérotonine et la somatostatine. Toutes ces hormones vont réguler des fonctions physiologiques

importantes telles que la motilité gastro-intestinale, la glycémie, la sécrétion d'hormones pancréatiques et d'enzymes digestives ainsi qu'influencer le renouvellement de l'épithélium intestinal (Roy *et al.*, 2012). La majorité des cellules entéroendocrines vont exprimer la chromogranine A qui est souvent utilisée pour visualiser ces cellules.

Les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées qui vont se retrouver dans le fond des cryptes intestinales, intercalées entre les cellules souches CBC. Ces cellules ont comme rôle principal de sécréter des peptides antimicrobiens tels que les α et β -défensines, les lysozymes et les cryptidines afin de limiter l'infiltration et l'adhésion des bactéries (Stappenbeck, 2010). De plus, elles ont été récemment démontrées pour être essentielles au maintien de la niche des cellules souches en sécrétant des facteurs comme MMP7 (*Matrix Metalloproteinase*), Wnt3a, TGF- α , EGF, et ligand Delta de Notch (Sato *et al.*, 2011; van Es *et al.*, 2005).

Les cellules caliciformes sont présentes du duodénum au côlon, mais dans un nombre qui est croissant jusqu'au côlon. C'est pourquoi elles représentent une grande proportion des cellules épithéliales du côlon. Leur fonction est de sécréter le mucus essentiel à la protection de la paroi intestinale face à l'érosion occasionnée par le passage du contenu luminal et des selles. Ce mucus va aussi contribuer fortement à former une barrière contre les bactéries retrouvées dans la lumière intestinale, ce qui permettra de limiter le contact direct avec les cellules épithéliales (Johansson *et al.*, 2008). Dans ce mucus, on retrouve plusieurs protéines différentes dont la mucine 2 qui est souvent utilisé pour la visualisation des cellules caliciformes.

1.2.3 Les jonctions cellulaires

Les cellules épithéliales forment la barrière entre le contenu luminal et la sous-muqueuse intestinale. Pour cette raison, elles doivent absolument posséder des jonctions étanches à cet environnement hostile, tout en permettant le passage de certains éléments tels que l'eau et les électrolytes. Les jonctions cellulaires sont

regroupées au niveau du complexe apical de jonctions pour permettre la jonction des membranes latérales des cellules épithéliales adjacentes.

Dans ce complexe, on retrouve trois différents types de jonctions soit les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. De façon similaire, ces trois différents types de jonctions sont composés de larges complexes de protéines transmembranaires et cytosoliques. Les protéines transmembranaires possèdent un domaine extracellulaire permettant des interactions homophiliques avec les autres protéines transmembranaires présentes sur les cellules épithéliales voisines. Leur domaine intracellulaire permet les interactions avec les protéines cytosoliques pour leur ancrage au cytosquelette. De cette façon, le rôle principal des protéines transmembranaires au sein du complexe apical de jonctions est d'assurer l'étanchéité de la barrière épithéliale en faisant des liens avec les cellules voisines. Pour leur part, les protéines cytosoliques des différentes jonctions vont assurer la rigidité et la stabilité des jonctions (Hartsock et Nelson, 2008). Elles vont assurer le lien entre les protéines transmembranaires de la jonction et le cytosquelette de la cellule. Pour chacune des jonctions retrouvées au niveau du complexe apical de jonctions on retrouvera un arrangement spécifique de protéines. Dans le domaine apical, on retrouve les jonctions serrées qui assurent la distinction entre les domaines apical et baso-latéral de la cellule. Les jonctions serrées sont nécessaires pour l'étanchéité de la membrane. Elles sont composées des protéines transmembranaires telles que les claudines (1 à 24 chez l'humain), occludine et JAM (*Junctional Adhesion Molecules*) ainsi que des protéines cytosoliques ZO-1 ou -2 (*Zonula Occludens*) (Anderson *et al.*, 2004).

Sous-jacent aux jonctions serrées, on retrouve les jonctions adhérentes permettant d'attacher fermement les cellules les unes aux autres. Dans ces jonctions adhérentes intestinales, les cadhérines sont les protéines transmembranaires qui s'attachent aux protéines cytosoliques α - et β -caténine. Ces jonctions ont pour fonction principale d'être l'ancrage des cellules au cytosquelette d'actine. Les desmosomes sont les jonctions retrouvées au niveau le plus basal et aléatoirement sur la membrane latérale. Ils ont des rôles similaires aux jonctions adhérentes et sont des points d'ancrage très

forts entre les cellules et le cytosquelette d'actine. Les desmosomes sont formés des protéines transmembranaires telles que la desmoglérine et la desmocolline qui vont s'associer à la protéine desmoplakine pour se lier aux filaments intermédiaires de la cellule.

Toutes les protéines cytosoliques des jonctions s'associent au cytosquelette de la cellule via les filaments d'actine ou les filaments intermédiaires. Le cytosquelette d'actine est bien connu pour avoir plusieurs rôles essentiels au sein de la cellule qui ne seront pas nécessairement discutés dans cet ouvrage. Toutefois, le cytosquelette d'actine possède aussi une influence et un rôle important au sein des différentes jonctions cellulaires. Puisque les jonctions sont fortement associées au cytosquelette, elles sont susceptibles à tous changements ressentis au niveau du cytosquelette d'actine. Par exemple, lorsqu'une cellule épithéliale intestinale doit migrer, elle nécessite l'internalisation des protéines de jonctions afin de se détacher des autres cellules. Ce phénomène peut être enclenché par la déstabilisation des protéines transmembranaires, mais inversement, il est aussi connu qu'une forte polymérisation de l'actine, comme c'est le cas dans la migration, va occasionner une internalisation des protéines transmembranaires des jonctions (Ivanov *et al.*, 2004). La polymérisation versus la dépolymérisation de l'actine est régulée par une panoplie de protéines comprenant entre autres l'Arp2/3, la cofiline, la thymosine et la profiline (Le Clainche et Carlier, 2008).

Les jonctions cellulaires ont plusieurs fonctions importantes au sein de l'intestin. En plus de permettre l'étanchéité de la barrière, elles assurent la structure de l'intestin et permettent le maintien de la polarisation et des fonctions digestives des cellules épithéliales (Bruewer *et al.*, 2006; Turner, J R, 2000). Il n'est pas étonnant de voir leur structure souvent compromise dans les différentes pathologies comme c'est le cas pour les maladies inflammatoires intestinales. (Bruewer *et al.* ; Groschwitz et Hogan, 2009) Par exemple, des dérégulations dans l'expression des protéines de jonctions comme les claudines causent des changements dramatiques dans la perméabilité intercellulaire intestinale et les échanges d'ions, phénomène pouvant mener jusqu'à des diarrhées

sévères (Prasad *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2008).

1.3 Les cellules mésenchymateuses

1.3.1 Les types de cellules mésenchymateuses

L'épithélium intestinal repose sur une couche de tissu conjonctif, le stroma ou la *lamina propria*, qui a longtemps été reconnu uniquement que pour son rôle de soutien à cet épithélium. Cette couche de tissu essentielle à l'homéostasie de l'intestin est composée de plusieurs types de cellules mésenchymateuses : les fibroblastes, les myofibroblastes, les péricytes, les cellules interstitielles de Cajal et les cellules de muscles lisses. On y retrouve aussi diverses cellules immunitaires ainsi que des petits vaisseaux sanguins et lymphatiques. En plus de son rôle de soutien, le stroma est maintenant connu pour son rôle important dans le maintien de l'homéostasie des tissus (Medema et Vermeulen, 2011)

Les différents types de cellules mésenchymateuses peuvent être semblables dans l'expression de certains marqueurs cellulaires et dans leurs origines. Toutefois, elles possèdent chacune des fonctions distinctes. Tout d'abord, les cellules de muscles lisses vont former une mince couche de muscle au niveau de la muqueuse qu'on appelle la *muscularis mucosae* et qui est essentielle à la contraction de la muqueuse. De plus, au niveau du centre de la villosité intestinale, on retrouve aussi des cellules musculaires permettant la contraction de ces villosités. Toutes les cellules musculaires expriment l'actine de muscle lisse (α SMA) comme certains autres types de cellules mésenchymateuses, mais elles expriment aussi la desmine qui est un marqueur spécifique pour ces cellules musculaires (Pinchuk *et al.*, 2010). Au niveau des cellules mésenchymateuses, on retrouve les cellules interstitielles de Cajal, qui sont situées dans la muqueuse et peuvent aussi être retrouvées dans la sous-muqueuse. Elles sont en association avec les cellules musculaires et sont localisées entre les fibres musculaires circulaires et longitudinales. Ces cellules ont des caractéristiques morphologiques des myofibroblastes, mais elles sont différentes par leur localisation et leurs fonctions. En fait, les cellules interstitielles de Cajal vont jouer le rôle de stimulateur de motilité pour les fibres musculaires, elles facilitent la propagation des événements électriques et

peuvent moduler la neurotransmission (Powell *et al.* (1999a)). Les péricytes sont un autre type de cellules mésenchymateuses qui s'apparentent aux myofibroblastes et elles sont souvent appelées les cellules murales. Ce sont des cellules qui expriment α SMA et elles sont localisées autour des capillaires sanguins. Elles permettent de déposer la matrice extracellulaire qui va former la membrane basale vasculaire retrouvée autour des capillaires. Les péricytes vont participer aux événements d'angiogenèse et de vascularisation en contrôlant la contractilité et la perméabilité des vaisseaux (Powell *et al.*, 2011).

Les fibroblastes sont les premières cellules de la *lamina propria* ayant été identifiées. Elles adoptent une forme scaphoïde et elles expriment principalement le marqueur mésenchymateux la vimentine. Elles peuvent être distinguées des cellules musculaires et des myofibroblastes par le fait qu'elles n'expriment pas l' α SMA et la desmine. Ce sont des cellules qui vont participer à la production des éléments de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance qui sont essentiels à l'homéostasie de la muqueuse. Les fibroblastes ont une capacité proliférative lente comparativement aux myofibroblastes et elles vont surtout servir de bassin de cellules pouvant venir repeupler les myofibroblastes si nécessaire (Pinchuk *et al.*, 2010). En fait, il est maintenant bien connu que la molécule TGF- β est capable d'induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Powell *et al.*, 1999a) .

Les myofibroblastes sont les cellules qui se retrouvent en contact direct avec les cellules épithéliales. Les myofibroblastes ont longtemps été vu comme un feuillet de fibroblastes plus dense au niveau des cryptes. En fait, elles possèdent une forme scaphoïde et certains marqueurs les rendant difficilement différenciables des fibroblastes (Powell *et al.* (1999a)). Il est maintenant clair que les myofibroblastes sont une population de cellules distinctes des fibroblastes. Les myofibroblastes portent leur nom car elles sont une sorte d'hybride entre les cellules musculaires et les fibroblastes. En fait, elles ont la même forme que les fibroblastes et expriment la vimentine comme ces derniers. En plus, elles possèdent des fonctions contractiles tout comme les cellules musculaires et elles expriment l' α SMA. Les myofibroblastes sont facilement

identifiables par l'utilisation de deux marqueurs simultanés, soit l' α SMA et la vimentine (Pinchuk *et al.*, 2010). En fait, les myofibroblastes sont considérés comme des fibroblastes activés. Ce sont des cellules très actives et prolifératives qui vont participer de façon plus importante à la production d'éléments de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance et de cytokines. Il n'est pas surprenant de voir que les myofibroblastes possèdent des fonctions importantes au développement et au maintien de l'homéostasie intestinale et qu'ils semblent avoir des rôles à jouer dans certaines pathologies digestives (Powell *et al.*, 2005).

1.3.2 Leur rôle dans le développement et l'homéostasie intestinale

Les différentes cellules mésenchymateuses ont des rôles distincts dans le développement et l'homéostasie du tube digestif. Puisque les myofibroblastes sont les cellules qui sont les plus biologiquement actives, ce sera la contribution des myofibroblastes dans ces processus qui sera discuté plus en profondeur dans ce travail. En fait, les myofibroblastes sont les cellules du mésenchyme en contact direct avec les cellules épithéliales et forment des interactions essentielles avec ces dernières. Les myofibroblastes sont donc les cellules qui participent aux interactions épithélio-mésenchymateuse indispensables au développement et l'homéostasie de l'intestin.

Tout d'abord, au niveau du développement, les myofibroblastes sont nécessaires à la morphogenèse de l'intestin puisqu'ils sont instructifs pour l'épithélium digestif (Roberts, 2000). Pour le développement du tube digestif, deux couches de tissus primaires sont essentielles, soit l'endoderme viscéral et le mésoderme. Ces 2 tissus se divisent selon l'axe rostro-caudal en 3 sections soit le tube digestif antérieur, qui va donner l'estomac, le duodénum et le pancréas, le tube digestif médian qui va donner les structures de l'intestin grêle et le tube digestif distal qui va former le côlon. Le mésoderme viscéral, au cours du développement, va se transformer pour donner les différents types cellulaires retrouvés dans le mésenchyme comme les myofibroblastes, les cellules musculaires, les neurones et les cellules immunitaires et endothéliales (McLin *et al.*, 2009). Ces différentes cellules vont produire les molécules lymphatiques, morphogènes, facteurs de croissance et de la matrice extracellulaire qui

vont instruire le devenir terminal du système digestif. Par exemple, il est démontré que Shh, produit par l'endoderme, va agir directement sur le mésoderme pour induire la production mésodermale de Bmp4, mais seulement dans le tube digestif médian et le tube digestif distal. En fait, Shh n'induit pas d'expression de Bmp4 dans le mésoderme du tube digestif antérieur. Bmp4 va ensuite limiter la croissance du mésoderme pour induire sa différenciation en des régions du tube digestif autre que l'estomac (Drucilla J. Roberts, 1995). De plus, de façons similaires, Shh induit l'expression du gène *Hoxd13* seulement dans le mésoderme du tube digestif distal pour favoriser la spécification et la différenciation de l'endoderme viscérale distal en côlon (Roberts *et al.*, 1998). Cette étude démontre qu'il y a une régionalisation de l'expression des gènes *Hox* dans le mésoderme primitif permettant par la suite la différenciation spécifique de l'endoderme. De plus cette étude démontre que cette régionalisation du mésoderme est déjà présente avant même l'induction de Shh par l'endoderme. Cette étude clé démontre que le mésoderme digestif est responsable de l'instruction et l'induction de la régionalisation spécifique de l'endoderme viscéral.

Les myofibroblastes découlant du mésoderme ont une importance dans le développement du tube digestif puisqu'ils participent aux interactions épithélio-mésenchymateuses par différentes voies de signalisation. Une étude effectuée au niveau du développement murin a démontré que les facteurs Foxf1 et Foxf2, des facteurs strictement mésenchymateux, sont contrôlés par l'expression épithéliale de Shh. De plus, ces facteurs de la famille Foxf sont responsables de l'induction de Bmp4 et de l'inhibition de Wnt5a pour contrôler la prolifération de cellules épithéliales. De plus, il est démontré que ce sont les myofibroblastes et les fibroblastes qui expriment les facteurs Foxf en plus d'induire la sécrétion de matrice extracellulaire nécessaire aux interactions et à la polarisation de l'épithélium (Ormestad *et al.*, 2006).

Les interactions épithélio-mésenchymateuses essentielles au développement du tube digestif, sont conservées chez l'adulte pour maintenir l'homéostasie du tractus gastro-intestinal (McLin *et al.*, 2009). Une étude, similaire aux études développementales sur les Hh, a suivi rapidement afin d'établir le rôle de cette voie au niveau de

l'homéostasie adulte. La signalisation des Hh fut démontrée essentielle pour maintenir la différenciation des myofibroblastes et induire la formation de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle murin. Un modèle de souris transgéniques permettant d'inhiber la signalisation des Hh spécifiquement dans l'épithélium intestinal fut utilisé dans cette étude. La signalisation fut inhibée grâce à la surexpression de l'inhibiteur des Hh, Hhip (*Hedgehog interacting protein*), sous le contrôle du promoteur de la *villine*. Dès la naissance, les souris possédant l'inhibition de la voie de Hh démontre une augmentation des cellules de muscles lisses ainsi qu'une diminution et une re-localisation des myofibroblastes. De plus, la perte de signalisation des Hh au niveau du mésenchyme adulte amène des modifications de la voie des Wnt et Bmp qui vont venir à leur tour affecter l'épithélium. En effet, l'épithélium de ces souris présente une augmentation de la prolifération et de la formation de cryptes ectopiques dans la villosité (Madison *et al.*, 2005). Cette étude démontre que les interactions épithélio-mésenchymateuses sont primordiales chez l'adulte comme dans le développement.

Les myofibroblastes sont un type cellulaire important pour la sécrétion des éléments de la matrice extracellulaire qui vont être retrouvés à l'interface des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses. Les myofibroblastes sont les principaux producteurs de collagène I et IV, ainsi que de fibronectine (Andoh *et al.*, 2007). De plus, ils produisent des quantités abondantes de protéoglycans, entre autres le syndécan et l'héparan sulfate. Les protéoglycans sont des protéines qui sont des glycosaminoglycans et qui font partie intégrante de la matrice extracellulaire (Powell *et al.*, 2005). Ils ont la capacité d'interagir avec plusieurs facteurs de croissance qui sont essentiels dans les interactions épithélial-mésenchyme. Entre autres, un des rôles des protéoglycans est de séquestrer des facteurs de croissance et chimiokines. Ils agissent comme co-récepteurs pour certains facteurs de croissance mais peuvent aussi agir comme ligand pour d'autres récepteurs. À l'opposé, les protéoglycans sont capables de séquestrer certains facteurs de croissance comme le TGF- β et des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire. La séquestration de ces facteurs les empêche d'être clivé pour leur maturation finale et les laisse dans un état latent. Plusieurs combinaisons d'interactions entre les protéoglycans et d'autres molécules sont

possibles et leur dérégulation occasionne une multitude d'effets. De cette façon, les myofibroblastes et leur production de protéoglycans influencent l'adhésion, la prolifération et la migration de cellules épithéliales. Les myofibroblastes produisent plusieurs protéines responsables du remodelage de la matrice extracellulaire soit les *matrix metalloproteinases* (MMPs). En fait les myofibroblastes sont capables de sécréter les MMPs-1, -2, -3 et les inhibiteurs des MMP TIMP-1 et -2. Les MMPs ont la capacité de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire, comme l'ensemble des collagènes I à XII et la fibronectine. Elles composent une grande famille de protéines qui sont essentielles les unes aux autres puisqu'elles s'activent mutuellement. De plus, différents facteurs de croissance et de cytokines sont capables d'induire la production de MMPs par les myofibroblastes. Ainsi, les myofibroblastes sécrètent plusieurs facteurs qui entraînent un dynamisme constant de la matrice extracellulaire et des interactions épithélio-mésenchymateuses (Andoh *et al.*, 2007).

La grande bioactivité des myofibroblastes leur confère un rôle dans l'établissement du microenvironnement qui influence directement les divers mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la migration et l'adhésion, et ce, autant chez les cellules de l'épithélium que celles du mésenchyme. À titre d'exemple, les myofibroblastes participent au maintien de la niche des cellules souches en sécrétant des molécules importantes pour réguler cette fonction. Ils sont capables de sécréter les ligands des Wnt non-canoniques, comme Wnt 2b, 4, 5a, 5b, ainsi que les antagonistes des Wnts, tels que Sfrp-1, -2 et Dkk-2, -3 (Powell *et al.*, 2011). La voie de signalisation canonique des Wnt est pro-proliférative et les myofibroblastes contribuent à restreindre cette signalisation en sécrétant les antagonistes des Wnt. De plus, en sécrétant des Wnt de la voie non-canonique, ils peuvent participer à deux autres voies distinctes, soit celle du PCP (*Planar cell polarity*) ou celle de la libération du calcium (Wnt/calcium). La voie du PCP, permet de réguler les kinases ROCK1 et JNK et influence la polymérisation et le remodelage du cytosquelette d'actine. De plus, la voie non-canonique Wnt/calcium est capable de promouvoir la libération du calcium intracellulaire du réticulum endoplasmique, un élément important pour réguler

différents processus cellulaires comme l'adhésion et la migration (Komiya et Habas, 2014).

Contrairement à la signalisation des Wnts, la voie de signalisation des Bmps est plutôt anti-proliférative et favorise la différenciation des cellules épithéliales. Les myofibroblastes sécrètent, dans la région des cellules souches, plusieurs antagonistes de la voie des Bmps, comme Chordin, Gremlin et Noggin, afin de favoriser la prolifération des cellules épithéliales (Powell *et al.*, 2011). De plus, Ihh est exprimé sous un gradient de concentration croissant vers le haut des villosités ou de l'épithélium de surface où sa principale action est d'activer une signalisation au niveau des myofibroblastes. Sous l'influence des Hh au niveau des villosités, les myofibroblastes sécréteront les ligands de Bmps comme Bmp4, phénomène déjà mentionné dans le développement intestinal. Il est démontré que l'épimorphine, une protéine strictement mésenchymateuse, peut moduler la sécrétion de Bmp4. En effet, la surexpression de l'épimorphine dans les myofibroblastes entraîne une plus grande sécrétion de Bmp4 (Fritsch *et al.*, 2002). De manière opposée, la délétion totale de l'épimorphine chez la souris cause une augmentation de la prolifération épithéliale intestinale associée à une diminution de la signalisation de Bmps et des Hhs ainsi qu'une augmentation de la signalisation des Wnts (Wang *et al.*, 2006).

Les myofibroblastes, en plus de toutes leurs fonctions énumérées ci-haut, sont des cellules impliquées dans l'immunité innée et adaptative de l'intestin. Effectivement, les myofibroblastes expriment les différents récepteurs de reconnaissance de pathogènes, les *Toll-Like Receptor* (TLR), qui représentent la première ligne de défense de l'immunité innée. L'activation des TLRs sur les myofibroblastes permet d'induire la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui entraînent le recrutement des cellules immunes présentatrice d'antigènes (Powell *et al.*, 2011). Ils sont capables de sécréter des cytokines comme IL1 β , IL6, IL8, et des chimiokines comme l'éotaxine (CCL11), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-2 (CXCL2) et le *stromal-derived factor-1* (SDF1/CXCL12) (Pinchuk *et al.*, 2010). Au niveau de l'immunité adaptative, ce sont surtout les lymphocytes T CD4⁺ qui sont responsables de cette réponse qui est dictée

par les cellules présentatrices d'antigènes. Il est maintenant suggéré que les myofibroblastes de l'intestin et du côlon possèderaient les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et de type II, ce dernier étant normalement présent seulement sur les cellules immunitaires présentatrices d'antigènes (Saada *et al.*, 2006). Certaines évidences démontrent que les myofibroblastes interagissent avec les lymphocytes régulateurs pour la présentation d'antigènes afin de promouvoir la tolérance intestinale face aux nutriments et au microbiote luminal. (Powell *et al.*, 2011). La nature bioactive du myofibroblaste confère à ce type cellulaire, qui est restreint en nombre au sein de la muqueuse intestinale, des rôles importants dans les pathologies digestives que ce soit dans les maladies inflammatoires ou les cancers.

1.4 Les cellules immunitaires

Les réponses immunitaires ainsi que les différents types de cellules immunitaires peuvent être divisés en deux grandes classes, soit celle de l'immunité innée ou de l'immunité adaptative. Ces deux types d'immunité permettent au corps humain de combattre efficacement les infections et les pathogènes auxquels l'organisme peut être confronté. L'immunité innée est la défense immédiate de l'organisme face à des agents infectieux. L'immunité adaptative est plus tardive et elle permet d'amplifier la réponse immunitaire, de conférer une réponse spécifique à un antigène et d'assurer une réponse mémoire pour une élimination plus rapide des pathogènes dans le cas de contacts répétés. Ces fonctions de l'immunité sont grandement présentes au niveau de l'intestin puisque son épithélium est en contact direct avec tout ce que contient la lumière intestinale, des nutriments aux bactéries. L'intestin doit se doter de mécanismes afin de réguler sa réponse immunitaire envers tous les adjuvants retrouvés dans la lumière. Il est donc nécessaire de posséder une tolérance immunogénique envers les bons éléments de la nutrition et le microbiote, tout en sachant ériger une réponse immunitaire adéquate dans le cas de contacts avec des pathogènes. Au niveau du tube digestif, on retrouve plusieurs structures permettant d'assurer une bonne maturité du système immunitaire. En fait, les cellules immunitaires, au niveau du tube digestif, vont se retrouver principalement dans les *gut-associated lymphatic tissues* (GALT) qui sont les plaques de Peyers, les follicules lymphatiques isolés, les nodules lymphatiques

mésentériques ainsi qu'en plus petite proportion dans la *lamina propria* (Koboziev *et al.*, 2010).

Pour permettre la régulation ainsi que l'efficacité des réponses immunitaires, les muqueuses intestinales et coliques vont comporter différents types de cellules immunitaires. Tout d'abord, pour les cellules ayant un rôle important à jouer dans l'immunité innée, on retrouve les monocytes et les granulocytes, mais aussi les cellules épithéliales qui sont de plus en plus reconnues pour leur importance dans la réponse innée. Les monocytes et granulocytes proviennent de la différenciation de la cellule souche myéloïde (Chaplin, 2003). Dans la famille des granulocytes, on retrouve les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Les deux derniers types sont pratiquement absents de la muqueuse intestinale et ils sont particulièrement impliqués dans la réponse allergique. En effet, ils expriment les récepteurs au IgE et se retrouvent à être les initiateurs clés de la réponse allergique. Les neutrophiles, pour leur part, sont plus susceptibles d'être retrouvés dans la muqueuse. Ce sont les premières cellules à être recrutées au niveau de tube digestif lors de la rencontre avec des pathogènes. Ils ont un rôle important dans la clairance des pathogènes de par leurs capacités de phagocytose et de réparation tissulaire par la sécrétion de cytokines et chimiokines (Chaplin, 2003).

Dans la famille des monocytes, on retrouve les macrophages et les cellules dendritiques. Les macrophages sont mobilisés au site d'inflammation rapidement après l'arrivée des neutrophiles et ils vont persister pour une longue période lors d'inflammation chronique ou d'infection. Les macrophages possèdent la capacité de présenter les antigènes aux lymphocytes T via leurs complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II (Chaplin, 2003). De plus, ils possèdent des rôles dans la réponse inflammatoire adaptative puisqu'ils sécrètent de nombreuses cytokines comme IL1 β , IL6, IL8 IL-12 et IFN- γ . Les cellules dendritiques proviennent de la même famille de cellules immunitaires que les macrophages, soit les monocytes. Les cellules dendritiques sont présentes dans la majorité des tissus et se localisent dans les tissus lymphoïdes secondaires, comme les follicules lymphatiques

isolés et la *lamina propria*. Tout comme les macrophages, les cellules dendritiques expriment les CMH de classe I et de classe II et représentent les principales cellules présentatrices d'antigènes de la muqueuse intestinale (Flannigan *et al.*, 2015).

La réponse immunitaire adaptative va mettre en jeu les cellules de la lignée lymphoïde. Dans cette lignée, on retrouve les lymphocytes NK (*Natural Killer*), les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes B sont principalement responsables de la production et la sécrétion d'anticorps. Les lymphocytes T, quant à eux, se divisent en différents types, soit les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (*helper*) pour la présentation d'antigènes, les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes T régulateurs (Th17). Les lymphocytes NK expriment le marqueur CD3 des lymphocytes T et des marqueurs spécifiques à eux. Ils participent à la réponse immunitaire en éliminant les pathogènes (Chaplin, 2003).

Les cellules immunitaires, peu importe le type, participent à l'homéostasie des tissus en régulant la tolérance immunogénique et en sécrétant des cytokines. Elles ont aussi des rôles fondamentaux dans les réponses inflammatoires de l'organisme, ce qui fait en sorte que les cellules immunitaires font partie de la pathogénèse de plusieurs maladies comme les maladies inflammatoires de l'intestin. Au niveau du cancer colorectal, différentes cellules immunitaires sont retrouvées dans le microenvironnement tumoral (Saleh et Trinchieri, 2011). Par les différentes cytokines produites, ces cellules vont contribuer à modifier le microenvironnement et promouvoir la progression de cancer colorectal.

1.5 Les pathologies de l'intestin et du côlon

1.5.1 Les maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des pathologies qui affectent plus 2 milliards d'américains et d'européens dans le monde, faisant de ces maladies celles possédant le plus haut taux d'incidence et de prévalence dans le monde. Depuis quelques années au Canada, les maladies inflammatoires intestinales se retrouvent plus

fréquentes que la sclérose en plaque, le sida et le diabète de type 1 avec un taux de prévalence de près de 1 personne atteinte sur 150. En effet, selon la fondation Crohn et Colite Canada, on dénombre plus de 9000 nouveaux cas de maladies inflammatoires intestinales chaque année au Canada. Ces maladies affectent directement la santé générale des patients en réduisant leurs capacités digestives et d'absorption des nutriments, tout en causant des sévères diarrhées et douleurs chroniques. On estime à plus de 750 millions de dollars dépensés par année par le système de santé, sans compter les coûts indirects reliés aux problèmes psychologiques et d'absentéisme qui s'élèvent à un milliard de dollars par année (Crohn et Colite Canada, 2015). Les personnes atteintes de ces pathologies souffrent de diarrhées chroniques, de crampes abdominales et de saignements rectaux (de Lange et Barrett, 2015). Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, on retrouve deux principales pathologies, soit la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, qui se distinguent par leurs différences pathophysiologiques, principalement au niveau du type de lésion et de la réponse immunitaire retrouvés ainsi que le tissu affecté. De façon générale, ces maladies sont décrites comme étant une réponse inflammatoire inadéquate de la muqueuse intestinale, soit face aux bactéries ou à tout autres antigènes luminaux, principalement chez une personne susceptible génétiquement. En fait, ces maladies sont caractérisées comme étant multifactorielles nécessitant absolument l'interaction entre des facteurs génétiques, environnementaux, immunitaires et le microbiote (Kaser *et al.*, 2010).

La maladie de Crohn est une maladie qui peut affecter toutes les régions du tractus gastro-intestinal. Elle est caractérisée par une inflammation qui va être discontinue et transmurale, donc qui pourra atteindre différentes régions du tractus mais toutes les couches du tissu. L'inflammation retrouvée au niveau de la maladie de Crohn est caractérisée par une réponse inflammatoire de type Th1 médiée par la présence de lymphocytes T et de macrophages qui forment des granulomes (Xavier et Podolsky, 2007). Étant une maladie dite multifactorielle, il est encore difficile de déterminer la cause exacte de cette pathologie. Toutefois, différentes analyses chez des patients atteints de ces maladies comparées à diverses études animales ont permis de confirmer des gènes ou voies de signalisations pouvant être impliqués dans la pathogénèse de

cette maladie. Tout d'abord, les analyses génétiques ou génomiques chez les personnes souffrant de maladie de Crohn ont démontré la présence de mutations associées à la susceptibilité de développer cette maladie. Les analyses génomiques ont mis en évidence la présence de différents loci contenant plusieurs gènes de susceptibilité se regroupant tous dans des catégories affectant essentiellement des fonctions du système immunitaire. Principalement associés à la maladie de Crohn, on retrouve des gènes dans la catégorie de l'autophagie et le contrôle de bactérie (*NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*), des gènes de la réponse immunitaire innée (*NKX2-3*, *CARD9*) et des gènes de la réponse immunitaire adaptative (*IL23R*, *TNFSF15*, *PTPN2*). Cette énumération n'est pas une liste exhaustive puisque plus de 200 loci ont été associés aux maladies inflammatoires avec un nombre incalculable de polymorphismes possibles rendant l'identification de facteurs initiaux encore impossible (de Lange et Barrett, 2015). Toutefois, ces analyses permettent de mettre en évidence certaines fonctions ou signalisation primordiales dans le développement de cette pathologie, à savoir l'autophagie, la reconnaissance des antigènes et la réponse immunitaire innée et adaptative. De plus, les études animales ont démontré que l'acquisition de ces mutations à elles seules ne sont pas suffisante pour induire la pathogénèse, démontrant encore plus fortement l'aspect multifactoriel de cette pathologie. Les études démontrent de plus en plus qu'il existe des changements importants dans la composition du microbiote entre les personnes atteintes de la maladie de Crohn versus les personnes saines (Manichanh *et al.*, 2012). Ces analyses suggèrent qu'une dysbiose du microbiote intestinal peut contribuer au développement de la maladie. Effectivement, chez les patients atteints de la maladie de Crohn, on observe une augmentation des bactéries néfastes pour la muqueuse, soit les Bactéroides et les Potréobactéries, ainsi qu'une diminution de Firmicutes, des bactéries favorisant l'homéostasie intestinale. La question fondamentale reste encore à savoir si la dysbiose à elle seule peut induire le développement des maladies inflammatoires (de Souza et Fiocchi, 2015).

La colite ulcéreuse, pour sa part, est une maladie qui touche la partie distale du tractus gastro-intestinal, soit de l'anus au côlon dépendamment de la progression de la

maladie. Cette pathologie se caractérise par une inflammation diffuse et continue, de type Th2, affectant seulement la muqueuse et parfois la sous-muqueuse. L'inflammation sévère causée par la production de médiateurs inflammatoires va mener au développement d'ulcérations de la muqueuse. Les caractéristiques histopathologiques de ces lésions sont la présence de neutrophiles dans la *lamina propria* et dans les cryptes menant au développement d'abcès de cryptes (Xavier et Podolsky, 2007). Les analyses génomiques à large spectre ont aussi permis d'identifier des gènes importants dans le développement de la colite. De façon intéressante, la plupart des mutations spécifiques à la colite se retrouvent sur des gènes affectant l'épithélium intestinal et sa fonction de barrière comme *HNF4A*, un gène régulant la différenciation de l'épithélium intestinal, *CDH1*, le gène de la E-cadhérine une protéine des jonctions adhérentes et *LAMB1*, le gène de la laminine- β 1 formant la lame basale entre l'épithélium et le mésenchyme (de Lange et Barrett, 2015).

Au niveau des maladies inflammatoires intestinales, le rôle des myofibroblastes est encore émergent. De plus en plus d'études tentent d'élucider leur comportement et leur potentiel thérapeutique dans diverses maladies. Étant de grands producteurs d'éléments de la matrice extracellulaire et de cytokines, ils sont connus pour leur rôle dans les maladies inflammatoires au niveau de la réparation de la muqueuse intestinale (Andoh *et al.*, 2007). Toutefois, lors d'une inflammation chronique, les dommages à la muqueuse dépassent la capacité régénérative du tissu, ce qui cause une sur-activation des myofibroblastes menant à la formation d'un tissu cicatriciel, processus appelé : la fibrose (Rieder et Fiocchi, 2009). Dans les phases sévères et chroniques d'inflammation, il y a beaucoup de sécrétions de cytokines, facteurs de croissance et de MMP qui sont produits en partie par les macrophages et les neutrophiles. Ces molécules dégradent la matrice extracellulaire, ce qui libère d'autres cytokines étant prises au piège dans la matrice. Ceci cause une infiltration massive de leucocytes qui viendront amplifier cette réponse inflammatoire. De plus, les cytokines et facteurs de croissance vont aussi recruter et activer les myofibroblastes (Rieder *et al.*, 2007). De par leur nature, les myofibroblastes au site de blessure vont sécréter beaucoup d'éléments de la matrice extracellulaire pour limiter le processus de dégradation et

enclencher celui de la réparation épithéliale. Ils vont aussi sécréter des facteurs de croissance pour stimuler la réparation épithéliale, mais aussi certaines cytokines pouvant à leur tour influencer les myofibroblastes et les cellules immunitaires. Dans certains cas, cela sera favorable à une excellente réparation rapide de l'intestin, principalement lorsque les processus sont bien régulés et s'arrêtent à temps. Dans d'autre cas, cela va mener à une boucle d'infiltration et d'activation de cellules immunitaires et de myofibroblastes créant une réparation excessive et menant ultimement à la fibrose. C'est pourquoi dans les maladies inflammatoires intestinales on voit souvent la présence de structures morphologiques aberrantes, qui sont en fait les conséquences d'un processus de réparation dérégulée menant à la fibrose (Rieder *et al.*, 2007).

1.5.2 *Le cancer colorectal*

Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par cancer au Canada et le troisième cancer le plus prévalent, faisant de ce cancer un des plus importants à étudier et à traiter. La grande définition du cancer est une prolifération anormale de cellules tumorales au niveau d'un tissu de façon à altérer les fonctions normales de ce tissu. Comme dans le cas d'autres maladies, le cancer colorectal peut être transmis de façon héréditaire, toutefois ceci représente une faible proportion d'environ 15% des cas (Schlussel *et al.*, 2014). Les cancers colorectaux héréditaires sont associés à des syndromes de polyposes comme le syndrome familiale de polypose adénomateuse (FAP), le syndrome de polypose juvénile (JPS), mais aussi au cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). (Mundade *et al.*, 2014) Les patients atteints des syndromes FAP et JPS, associés aux mutations des gènes *APC* et *SMAD4/BMPRI1A* respectivement, possèdent des taux de risque de développer le cancer qui augmentent avec l'âge, comme décrit dans la section suivante 1.5.3. Le HNPCC se retrouve à être la forme de cancer colorectal héréditaire la plus fréquente et elle est associée à des mutations dans des gènes importants pour la réparation de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) (Lynch et Smyrk, 1999).

En fait, le cancer colorectal sporadique représente plus de 80% de tous les cancers du côlon. N'étant pas associé à des mutations pouvant être transmises héréditairement, plusieurs études tentent de comprendre le développement et les facteurs de risque associés au cancer colorectal. Certains facteurs de risques sont maintenant bien connus que ce soit une mauvaise alimentation, l'absence d'activité physique et des facteurs environnementaux, entre autres carcinogènes, qui vont favoriser l'acquisition de mutations somatiques dans les cellules épithéliales. Le cancer colorectal sporadique va se développer par une série d'accumulation de mutations génétiques au sein d'une cellule somatique (Grady et Markowitz, 2002). Ces mutations acquises vont mener à la formation d'une cellule cancéreuse qui possède des caractéristiques spécifiques dont une prolifération incontrôlée pour générer d'autres cellules cancéreuses et la résistance à l'apoptose. Cette accumulation de cellules cancéreuses va mener à une série de modifications physiologiques successives menant à la formation d'une tumeur et affectant les fonctions du tissu. Les études génétiques chez les patients atteints de cancer colorectal sporadique ont permis de mettre en évidence une séquence d'évènements génétiques associés aux modifications histopathologiques retrouvées dans le tissu, de l'adénome au carcinome. Avec les années, cette séquence d'évènements s'est complexifiée et divisée selon l'ordre et les différentes mutations acquises. On retrouve maintenant trois différentes séquences d'évènements soit : la voie de l'instabilité chromosomique, la voie de l'instabilité des microsatellites et la voie à dents de scie (*Serrated*) (Mundade *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont permis d'identifier des mutations clés dans le développement du cancer colorectal, dont des mutations dans le gène *APC* se retrouvant dans plus de 80% des cas des cancers colorectaux. Les analyses séquentielles sur les différentes étapes de la carcinogenèse ont révélé que les mutations d'*APC* se retrouvent dès les premières étapes du développement du cancer, des foyers de cryptes aberrants à l'adénome, deux types de lésions précancéreuses. La protéine APC participe à la signalisation des Wnt ainsi les mutations d'*APC* mènent à la libération de la β -caténine causant une suractivation de la signalisation des Wnt et la transcription de gènes protumoraux (c-Myc) ou pro-prolifératifs (cyclinD1) (Grady et Markowitz, 2002;

Mundade *et al.*, 2014). Une autre mutation bien connue est la mutation du gène *K-RAS*, un des plus importants proto-oncogènes du cancer colorectal. Les mutations du gène *K-Ras* mènent à son activation constitutive et suractive la signalisation des MAPK (*Mitogen Activating Protein Kinase*). Les mutations de *K-RAS* semblent suivre celles du gène *APC* dans la carcinogenèse et elles sont associées à des lésions adénomateuses plus avancées. En fait, les mutations *K-Ras* semblent être importantes dans la séquence allant de l'adénome au carcinome. Elles permettent d'induire la croissance des adénomes vers les carcinomes pour promouvoir le développement du cancer colorectal (Grady et Markowitz, 2002). Vers la fin de la séquence d'évènements génétiques du cancer colorectal, on retrouve des mutations dans le gène *TP53*. La protéine p53 agit comme facteur de transcription pour maintenir la stabilité génomique en contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose en cas de stress génotoxique. Les mutations de ce suppresseur de tumeurs sont associées aux étapes tardives du développement du cancer principalement pour assurer la transition entre l'adénome et le carcinome. Ainsi, les mutations de *APC*, *K-Ras* et *TP53* récapitulent en partie les principaux évènements génétiques retrouvés dans le cancer associé à l'instabilité chromosomique.

Des mutations somatiques dans des gènes de la superfamille du TGF- β sont retrouvées dans le cancer colorectal, par exemple des mutations somatiques dans le gène *TGFR2* sont retrouvées dans 15% des cas de cancer de type instabilité des microsatellites. Des mutations somatiques dans les gènes *SMAD2* et *SMAD4* sont aussi retrouvées dans les cas de cancers sporadiques et ce, dans près de 15% des cas. Ce pourcentage augmente grandement pour *SMAD4* qui est communément retrouvé dans les étapes plus tardives du cancer colorectal et des métastases (Grady et Markowitz, 2002; Mundade *et al.*, 2014). En fait, ces trois gènes suppresseurs de tumeurs se retrouvent sur le chromosome 18q une région spécifiquement ciblée par des mutations assurant la perte de fonction de ces gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer colorectal. En fait, ces mutations se retrouvent au même niveau que les mutation de *K-Ras* dans la séquence du cancer colorectal, soit pour promouvoir la croissance de l'adénome et favoriser le développement du carcinome (Mundade *et al.*, 2014).

Le cancer colorectal est un cancer épithélial, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses qui vont se développer sont d'origine épithéliale et que la pathogénèse et les mutations associées se retrouvent principalement au niveau de l'épithélium (Hanahan, D. et Weinberg, 2000). Les connaissances croissantes des modifications épithéliales ont permis des avancées importantes dans le domaine de la recherche et du traitement du cancer colorectal. En autres, elles ont permis de faire ressortir les caractéristiques acquises par les cellules afin de posséder des fonctions cancéreuses. Dans ces caractéristiques, on retrouve la capacité de croissance sans signal adéquat, l'évasion de l'apoptose, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs ainsi que la capacité d'invasion des tissus et de formation de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Malgré le fait que le cancer colorectal soit causé par des événements génétiques survenant au niveau des cellules épithéliales, 60% de la masse des tumeurs colorectales est composée de cellules stromales, dont les cellules mésenchymateuses et les cellules immunitaires. De plus, les études *in vitro* et les différents modèles murins démontrent que les cellules cancéreuses nécessitent un microenvironnement précis et des interactions avec différents autres types cellulaires afin de permettre la formation de tumeurs cancéreuses (Bhowmick et Moses, 2005). Il est maintenant accepté que les différentes séquences d'événements génétiques, se produisant dans les cellules épithéliales, sont insuffisantes à elles seules pour reproduire la cascade complète d'événements allant jusqu'au carcinome. En fait, il est clairement démontré que le microenvironnement et les cellules stromales sous-jacentes aux cellules épithéliales cancéreuses ont un rôle très important à jouer dans l'initiation et la progression tumorale (Bhowmick et Moses, 2005).

En effet, le microenvironnement tumoral est maintenant reconnu comme étant une caractéristique essentielle pouvant favoriser l'acquisition des fonctions cancéreuses comme la prolifération, la survie et l'invasion (Hanahan, D. et Weinberg, 2011). Le microenvironnement tumoral va contenir plusieurs types cellulaires qui vont produire différentes molécules bioactives influençant directement la croissance et la progression tumorale. Entre autres, l'inflammation retrouvée au niveau tumoral est une caractéristique de ce microenvironnement qui favorise l'acquisition des traits

spécifiques aux cellules cancéreuses. Dans ce microenvironnement, on retrouve une variété de cellules immunitaires comme les neutrophiles, les macrophages et des lymphocytes T. Ces cellules immunitaires sécrétant des molécules bioactives dans le milieu tumoral comme des facteurs de croissance favorisant la prolifération, des signaux de survie pour empêcher l'apoptose des cellules cancéreuses ainsi que des MMPs pour dégrader la matrice extra-cellulaire et permettre l'invasion et les métastases. De plus, ces cellules immunitaires vont sécréter différentes cytokines et chimiokines qui vont influencer les autres types cellulaires retrouvés au niveau du microenvironnement comme c'est le cas pour l'IL1 β , IL6, IL8, CCL2 et CCL8. En plus de ces cellules immunitaires, le microenvironnement tumoral est aussi composé d'une variété de cellules endothéliales contrôlant l'angiogénèse et de cellules mésenchymateuses permettant le soutien et la progression de la tumeur. Dans ces cellules mésenchymateuses, on retrouve les fibroblastes et les myofibroblastes qui sont nommément appelés les CAF (Cancer-associated-fibroblast) lorsque retrouvés dans un milieu tumoral. Ces CAF ont été démontrés pour favoriser la prolifération, l'invasion et l'angiogénèse des cellules cancéreuses. Leur activité qui promouvoit la formation de tumeurs est maintenant démontré par différentes techniques comme la transplantation de ces CAF avec des cellules cancéreuses et la modification génétique ou pharmacologique de ces CAF dans des modèles tumorales murins (Bhowmick et Moses, 2005; Franco *et al.*, 2011).

Une étude pertinente abordant ce concept est celle de l'équipe de Leone en 2009 qui démontre le rôle de *PTEN* dans les fibroblastes au niveau du cancer du sein. Les chercheurs de cette étude ont utilisé un modèle murin de délétion conditionnelle de *PTEN* dans les fibroblastes combiné à un modèle de cancer des glandes mammaires. La délétion de *PTEN* dans les fibroblastes induit une augmentation de matrice extracellulaire, mais n'affecte pas la transformation des cellules épithéliales. La combinaison de cette délétion avec un modèle murin de cancer du sein mène à une augmentation rapide de la taille des tumeurs mammaires. Ces tumeurs possèdent des modifications de la matrice extracellulaire, une infiltration de cellules immunitaires et une forte angiogénèse. La perte de *PTEN* dans les fibroblastes retrouvés dans les

tumeurs mammaires apporte des modifications du microenvironnement tumoral qui sont aussi retrouvés chez les patients atteints de cancer du sein (Trimboli *et al.*, 2009). Cette étude a démontré que *PTEN* spécifiquement au niveau des fibroblastes possède un rôle essentiel pour réguler la composition du microenvironnement stromal et permet de limiter la croissance tumorale. Elle démontre aussi que les cellules mésenchymateuses sont des joueurs clés dans la carcinogenèse.

Une autre étude au niveau de l'intestin a démontré que la signalisation de *Ihh* au niveau des cellules mésenchymateuses est essentielle pour la formation d'adénome. Cette étude cible de façon moins spécifique les cellules mésenchymateuses puisque les chercheurs utilisent un modèle murin de doubles délétions conditionnelles de *Ihh* et *APC* dans l'épithélium intestinal. La délétion de *APC* dans l'épithélium est un modèle très utilisé pour l'étude de l'initiation du cancer puisque plusieurs adénomes se forment dans l'intestin et le côlon de ces souris. Les ligands *Ihh* possèdent une signalisation qui est majoritairement paracrine et ils agissent sur les cellules mésenchymateuses, principalement les myofibroblastes et les fibroblastes. La délétion de *Ihh* au niveau de l'épithélium combiné au modèle *APC* a mis en évidence une réduction du nombre et de la taille des adénomes. Chez les adénomes possédant la délétion de *Ihh*, on observe une diminution des gènes cibles de la voie des Hh (*Foxf2*, *Bmp4*, *Inhba*) au niveau mésenchymateux ainsi qu'une perte d'expression de Cox-2 (Cyclo-oxygénase 2) (Buller *et al.*, 2015). Cette étude démontre de façon différente que les cellules mésenchymateuses possèdent des rôles importants dans l'initiation et la croissance tumorale. En effet, la signalisation des *Ihh* agissant spécifiquement sur les cellules mésenchymateuses est nécessaire pour contrôler le phénotype mésenchymateux permettant l'initiation et la croissance des adénomes.

Maintenant, il est évident que les cellules mésenchymateuses contribuent à modifier le microenvironnement tumoral pour favoriser l'initiation et la progression du cancer (Glaire *et al.*, 2012). Plus spécifiquement pour les myofibroblastes, dans un état pathologique, se retrouvent dans un état activé puisque leur bioactivité est augmentée comparativement à celle des myofibroblastes à l'état d'homéostasie (Hinz *et al.*, 2007).

Dans le cancer colorectal, les myofibroblastes retrouvés dans le milieu tumoral sont appelés les *Cancer-Associated-Fibroblasts* (CAFs) puisqu'ils possèdent les caractéristiques des myofibroblastes activés. Ainsi, les CAFs possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques des myofibroblastes, dont la forte expression de α SMA. Les CAFs isolés de tumeurs colorectales démontrent des niveaux élevés de sécrétion de facteurs de croissance pouvant influencer le comportement des cellules épithéliales cancéreuses. Ces facteurs de croissance vont aussi influencer directement les myofibroblastes et les cellules immunitaires retrouvés dans le microenvironnement tumoral. Parmi ces molécules sécrétées par les CAFs, on retrouve le TGF- β 1, le SDF-1, la fibronectine, la tenascine C et le HGF (De Boeck *et al.*, 2013). Une étude analysant le profil protéomique des CAFs retrouvés dans des tumeurs colorectales humaines a révélé que les CAFs ont une plus grande expression protéique de follistatine et LTBP2, deux molécules affectant la signalisation du TGF- β . Ils observent aussi une plus grande sécrétion de chimiokines comme CCL2, CCL8 et CCL11 qui possèdent des pouvoirs pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs sur des cellules cancéreuses en culture (Torres *et al.*, 2013). De plus, ces cytokines ont de grands pouvoirs attractants sur différents types de cellules immunitaires, comme les lymphocyte T, les neutrophiles et les macrophages. Les CAFs possèdent une plus grande production de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1 β , IL6 et IL8 qui ont des effets importants sur les cellules tumorales épithéliales, les cellules immunitaires et les myofibroblastes (Quante *et al.*, 2011). Ces cytokines ont plusieurs actions différentes sur le myofibroblaste, que ce soit de stimuler leur activation, de promouvoir leur apoptose et d'induire une réponse inflammatoire (Francoeur *et al.*, 2009; Shaker *et al.*, 2014).

L'interaction existante entre les cellules tumorales, les cellules immunitaires et les myofibroblastes dans un contexte tumoral est bien démontré, mais nécessite d'avantage de recherches afin d'éclaircir le rôle de chacun. L'implication des myofibroblastes dans les pathologies digestives est incontestable. Toutefois des études supplémentaires sont essentielles afin de démontrer la participation directe des myofibroblastes dans l'initiation et la progression du cancer.

1.5.3 Les syndromes de polypose

Les syndromes de polyposes intestinales sont des maladies rares héréditaires qui sont associées à l'augmentation des risques de développer un cancer. Les syndromes sont catégorisés en deux grandes classes, soit celles où les polypes sont de type adénomateux et la catégorie prédominante de polypes de type hamartomateux. La première catégorie comprend principalement le syndrome familial de polypose adénomateuse (FAP) associé à des mutations dans le gène *APC*. Ces mutations résultent en la perte de la protéine APC qui séquestre la β -caténine, ce qui augmente la stabilité de cette dernière et permet sa translocation au noyau pour induire la transcription de gènes pro-prolifératifs. La grande résultante de cette mutation est la formation de multiples micro-adénomes colorectaux qui potentialisent les risques de développer un cancer colorectal. De plus, ces polypes se distinguent de l'autre catégorie puisqu'ils sont causés majoritairement par des altérations au niveau des cellules épithéliales et du compartiment prolifératif (Half *et al.*, 2009)

Dans la deuxième catégorie, on retrouve plusieurs syndromes qui ont tous la même caractéristique de développer des polypes de type hamartomateux qui sont plutôt définis par la présence d'éléments cellulaires intestinaux normaux, mais avec une architecture grandement affectée (Zbuk et Eng, 2007). Dans ces syndromes, on retrouve le syndrome de polypose juvénile (JPS), le syndrome Peutz-Jeghers (PJS) et le syndrome des tumeurs PTEN hamartomateuses (PHTS). Pour le PJS, les polypes sont retrouvés plus fréquemment au niveau de l'intestin et de l'estomac. Ces polypes vont être caractérisés par une prolifération accrue des cellules de muscles lisses avec une formation de polypes très allongés et contenant des embranchements. Le PJS est associé avec une mutation germinale dans le gène *STK11* (Sérine-Thréonine Kinase 11) dans près de 70% des cas. Le sous-groupe PHTS a été créé pour regrouper tous les syndromes de polyposes associés à des mutations germinales dans le gène suppresseur de tumeur *PTEN*, dont le syndrome de Cowden, où cette mutation est retrouvée dans plus de 85% des cas. Les polypes retrouvés dans ces types de syndromes vont être de

type hamartomateux et nécessitent une caractérisation approfondie pour les associer au type précis.

Finalement, le JPS est le syndrome qui est le plus en lien avec le sujet principal des études effectuées dans cette thèse. Comme le mot juvénile le décrit, la majorité des cas de JPS vont être diagnostiqués tôt dans la vie, souvent avant 20 ans. Les polypes des patients atteints de JPS sont présents en très grand nombre, jusqu'à une centaine, et peuvent se retrouver partout dans le tractus gastro-intestinal, mais principalement au niveau du côlon. Notons que seulement 20% des polypes se retrouvent dans l'estomac et l'intestin. Les polypes de types JPS sont souvent sphériques et quelques fois pédiculés et peuvent atteindre plusieurs centimètres de diamètre. Au niveau microscopique, leurs caractéristiques principales retrouvées sont des glandes dilatées et remplies de mucus, une importante infiltration de cellules immunitaires ainsi qu'une prolifération accrue des cellules mésenchymateuses de type myofibroblastes, et non des cellules musculaires comme on le retrouve chez les patients atteints de PJS (Brosens *et al.*, 2011). Les principales mutations associées au JPS touchent des molécules appartenant à la superfamille du TGF- β . En fait, plus de 20% des patients ont des mutations touchant le gène *SMAD4* et un autre 20% possèdent une mutation dans le gène du récepteur *BMPRI1A*, leur donnant ensemble une prévalence dans plus 50-60% des cas de JPS. De plus, des mutations pour d'autres composants de la signalisation du TGF- β , comme le gène *ENG* (endogline), sont aussi retrouvées, mais leur prévalence est encore inconnue et reste à être déterminée (Zbuk et Eng, 2007). Les polypes colorectaux possédant des mutations pour *SMAD4* vont posséder une augmentation de la prolifération principalement au niveau des cellules épithéliales et moins de modulations des composants du stroma comparativement aux polypes ayant des mutations pour *BMPRI1A* (Brosens *et al.*, 2011). Des études subséquentes semblent démontrer que les mutations du gène *BMPRI1A* se retrouvent principalement dans le stroma et non dans l'épithélium comme précédemment proposer (Brosens *et al.*, 2011). Cette information suggère que ces mutations stromales agiraient comme des modulateurs du microenvironnement et finiraient par entraîner des modifications néoplasiques au niveau des cellules épithéliales (Kinzler et Vogelstein, 1998). Ce

concept a déjà été proposé pour participer à la carcinogenèse, mais il est encore peu étudié. Toutefois, il fait un lien vraisemblable entre la génétique des polypes de types JPS et le risque associé élevé de développer un cancer colorectal qui atteint près de 60% vers 60 ans chez ces individus.

1.6 La signalisation des Bmps

1.6.1 La signalisation des Bmps de l'intestin et du côlon

Les Bmps ont été découverts grâce à leur rôle dans la formation de l'os et du cartilage ectopique. Les Bmps sont des morphogènes qui appartiennent à la super famille du TGF β . Ils agissent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères leur conférant plusieurs rôles reconnus dans des processus cellulaires tant au niveau du développement que dans l'homéostasie de tout l'organisme (Roberts, 2000). Les ligands présents dans l'intestin et le côlon sont Bmp2, Bmp4 et Bmp7 et ils agissent via les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase de type I (Bmpr1a et Bmpr1b) et de type II (BmprII) (Auclair *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Une fois liés à leurs récepteurs, il y a activation d'une signalisation intracellulaire menant à l'activation des effecteurs spécifiques aux Bmps, les BR-Smad soit Smad1, Smad5 et Smad8 (Figure 3). Ces effecteurs comportent beaucoup de similitudes avec Smad2 et Smad3, les effecteurs de la voie du TGF β , mais leur spécificité à la voie des Bmps est assurée par leurs différents domaines d'interactions protéiques permettant de lier les récepteurs des Bmps. À la suite de leur phosphorylation, les Smad1-5-8 vont pouvoir s'associer au co-Smad (Smad4) pour permettre leur translocation au noyau, mais aussi la transcription de gènes cibles (Massagué, 1998). Parmi les gènes cibles connus, on retrouve les gènes *ID1* à 3 (*Inhibitor of DNA binding 1* à 3), mais aussi plusieurs éléments inhibiteurs de la voie des Bmps, comme les antagonistes noggin et chordin, ainsi que les Smad inhibiteurs Smad6 et 7 permettant une boucle de rétro-inhibition sur cette voie. Toutefois, il reste encore beaucoup de gènes cibles à identifier, puisque ceux déterminés jusqu'à maintenant ne peuvent expliquer la complète biodiversité des effets produits par les Bmps.

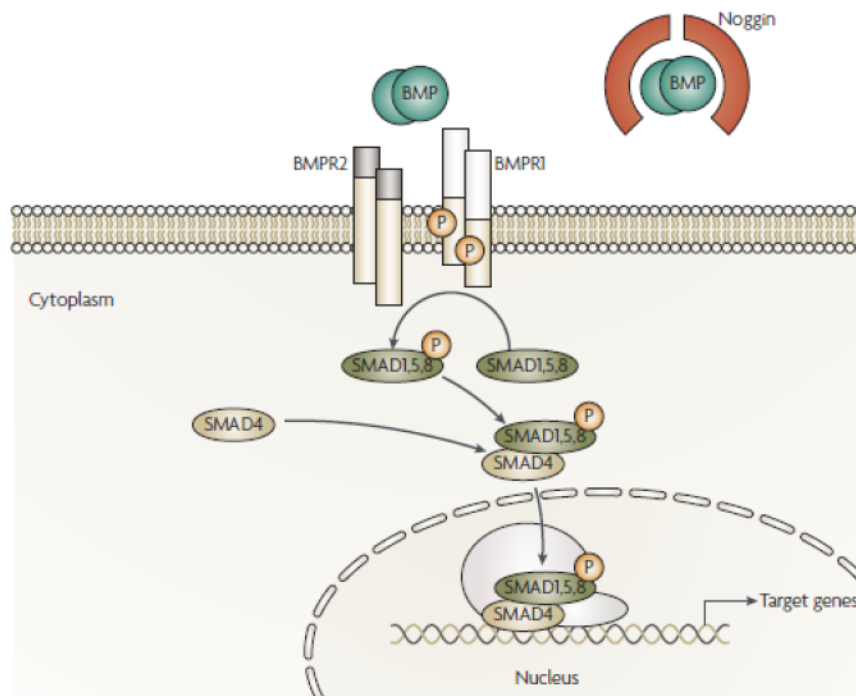


Figure 3: Schématisation de la signalisation des Bmps

Les dimères de Bmps se lient aux récepteurs des Bmps de type I et II ce qui induit un changement de conformation des récepteurs. Le récepteur de type II peut ainsi phosphoryler le récepteur de type I. Ce dernier peut ensuite phosphoryler les BR-Smad (Smad 1, 5 et 8) qui vont former un hétérocomplexe avec le Co-Smad (Smad4). Cette interaction avec Smad4 permet la translocation au noyau des effecteurs, où ils peuvent interagir avec divers cofacteurs pour moduler la transcription de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, on retrouve les *ID1*, *ID2*, *ID3* et les *I-Smads* permettant ainsi de créer une boucle de rétro-inhibition de la voie. Figure tirée de Hardwick *et al.*, (2008) Licence # 3763270403917.

Plusieurs molécules endogènes sont capables d'inhiber la signalisation de Bmps, que ce soit dans le milieu extracellulaire ou dans le cytoplasme. De plus, la plupart de ces molécules font parties des gènes cibles des Bmps assurant l'inhibition graduelle de la voie de signalisation suite à son activation. Tout d'abord, dans le milieu extracellulaire intestinal et colique, on retrouve noggin, chordin, gremlin et twisted gastrulation qui sont des antagonistes interagissant avec les ligands Bmps pour les empêcher de lier leurs récepteurs (Li *et al.*, 2007; Massagué, 1998). Il y a aussi le pseudo-récepteur Bambi qui est très similaire au récepteur de type I. Il peut être considéré comme un antagoniste extracellulaire puisqu'il va interagir avec le récepteur de type II et lier les ligands dans le milieu extracellulaire sans entrainer de cascade de

signalisation intracellulaire. Au niveau intracellulaire, on retrouve diverses molécules capables de venir inhiber la signalisation des Bmps. Tout d'abord, on retrouve des molécules très similaires aux effecteurs, les I-Smads, Smad6 et Smad7, qui inhibent la signalisation intra-cellulaire, mais de façon différente. Par exemple, le Smad6 activé lie les différents BR-Smad et les empêche de se lier au Smad4 et de transloquer au noyau. Pour sa part, Smad7 interagit avec les récepteurs de type I activés, empêchant l'activation subséquente des BR-Smads. En plus, les différents I-Smad collaborent à recruter les Smurfs qui sont des ubiquitines ligases permettant la dégradation des récepteurs ou des BR-Smads.

En plus d'avoir des rôles essentiels dans la formations des os, la signalisation des Bmps s'avère importante pour les étapes cruciales de l'embryogénèse ainsi que pour plusieurs processus cellulaires nécessaires au maintien de l'homéostasie à la vie adulte. Au départ, les études sur la signalisation des Bmp se sont concentrées sur leur rôle dans le développement de l'embryon. En effet, les études effectuées chez *Drosophila melanogaster* utilisant des mutants pour *Decapentaplegic (Dpp)*, l'homologue de Bmp2 et Bmp4 chez la drosophile, démontrent des anomalies importantes dans la régionalisation dorso-ventral du blastoderme, une des premières étapes de développement (Ray *et al.*, 1991). De plus, l'utilisation de Bmp4 humain est capable de renverser ce phénotype, démontrant leur grande homologie de fonctions entre l'humain et la drosophile. Ces études suggèrent que cette signalisation aurait un rôle important dans la régionalisation des vertébrés et mammifères. Les analyses des patrons d'expression de Bmp2 et Bmp4 effectuées chez des embryons de souris démontrent qu'ils sont exprimés dans plusieurs tissus en formation, comme le cœur, les poumons et les intestins (Francis *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1991). Ces résultats supportent l'idée que la signalisation des Bmps possède d'autres rôles à jouer que celui associé à leur découverte dans la formation des os.

À partir de ce moment, les modèles murins de délétion totale des éléments de la signalisation des Bmps ont vu le jour. Les premières études ont démontré que les souris possédant une délétion totale pour *Bmpr1a* ne sont pas viables et meurent *in utero* vers

le neuvième jour embryonnaire. Les souris possèdent plusieurs défauts au niveau de l'embryogenèse dont aucune induction du mésoderme. En fait, les souris possèdent les trois couches de tissus primitifs (endoderme, ectoderme, mésoderme), mais la prolifération, le nombre de cellules et la différenciation découlant du mésoderme sont grandement diminués (Mishina *et al.*, 1995). Ces résultats démontrent que la signalisation des Bmps n'est pas essentielle pour l'implantation de ces trois couches. Toutefois, elle est primordiale pour les étapes de post-implantation suivant l'étape de gastrulation. Donc, la signalisation des Bmps est requise pour les événements inductifs subséquents à la gastrulation pour permettre la formation du mésoderme ainsi que la différenciation de ce dernier en ses différents types cellulaires. Le mésoderme est responsable de la formation des muscles et du mésenchyme, tandis que l'endoderme forme les différentes lignées épithéliales de l'organisme. Par la suite, les modèles murins de délétions totales des effecteurs de la signalisation des Bmps, *Smad1* et *Smad5* ont supporté leur rôle dans le développement et l'embryogenèse. Dans les deux cas, les souris mutantes meurent dans les étapes embryonnaires précoces, soit entre le neuvième et le onzième jour embryonnaire (Chang, Hua *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2001). Les deux modèles possèdent des défauts importants dans le développement des tissus extra-embryonnaires. De façon intéressante, les souris mutantes pour *Smad5* démontrent des défauts importants des tissus embryonnaires primitifs allant former le tube digestif, le cœur et les poumons (Chang, Hua *et al.*, 1999). Cette étude a permis de mettre en évidence que la signalisation des Bmps pouvaient réguler le développement de l'intestin.

1.6.2 Les études antérieures de la signalisation des Bmps dans l'intestin

Au niveau de l'intestin et du côlon, la signalisation des Bmps est complexe. On retrouve certains éléments spécifiques de la signalisation des Bmps qui sont exprimés et d'autres qui sont absents. En effet, seulement les ligands Bmp2, Bmp4 et Bmp7 ainsi que seulement le récepteur Bmp de type Ia (Bmpr1a) et son co-récepteur BmpRII sont présents dans la muqueuse intestinale. De plus, ces différents récepteurs sont exprimés dans les deux compartiments cellulaires de la muqueuse soit l'épithélium et le mésenchyme, suggérant une signalisation bidirectionnelle entre ces deux entités

(Auclair *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Cette signalisation est capable d'être activée dans les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses, particulièrement au niveau du développement, où elle permet au mésoderme d'acquérir une identité spécifique et contribue aux interactions épithélium-mésenchyme (Gao *et al.*, 2009; Haramis *et al.*, 2004; Madison *et al.*, 2005; McLin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006).

Les modèles de délétion classique sont tous non viables, il est donc impossible d'étudier correctement l'implication des Bmps au niveau de l'intestin avec ces modèles. La génération des modèles de surexpression ou de délétion conditionnelle a permis d'éclaircir leur rôle au niveau d'un tissu spécifique en permettant de moduler des éléments de la voie dans quelques types cellulaires à la fois. La première étude publiée a utilisé une surexpression de Noggin, sous le contrôle d'un promoteur de la *villine* permettant de cibler l'expression uniquement dans les cellules épithéliales de l'intestin et du côlon (Madison *et al.*, 2002). Noggin est un antagoniste de la signalisation des Bmps qui va agir en se liant aux ligands pour les empêcher d'interagir avec les récepteurs. Dans ce modèle de souris transgéniques, il est donc surexprimé par l'épithélium et sécrété dans la muqueuse pour antagoniser les ligands présents. La signalisation des Bmps est inhibée dans tous les types cellulaires qui pourront être en contact avec ce Noggin exogène, soit les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les cellules sanguines présentes dans la *lamina propria*. Ce modèle murin développe des cryptes ectopiques perpendiculaires à l'axe crypte-villosité qui vont mener à la formation de polypes intestinaux. Ces phénotypes sont caractérisés par une augmentation de la prolifération cellulaire causée par une activation soutenue de la voie Wnt/ β -caténine. De plus, les polypes observés dans ce modèle sont une phénocopie de ceux retrouvés dans le syndrome JPS, associé à une prédisposition au cancer (Haramis *et al.*, 2004).

Dans la même année, une étude similaire a proposé des résultats très similaires tout en utilisant un modèle murin différent. Ce modèle est une délétion conditionnelle de *Bmpr1a*, grâce à l'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur inductible *Mx1*. Mx1 est une protéine de réponse à l'interféron qui n'est pas présente

dans un individu en santé. Le promoteur Mx1 utilisé est transcriptionnellement activé avec de hauts niveaux d'interféron (IFN α ou IFN β) ou avec l'acide polyionosinique-polycitilyque (polyI:C), un ARN double brin synthétique. Après injection de polyI:C, la Cre est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et intestinales. Elle permet ainsi la délétion de *Bmpr1a* dans les lignées cellulaires découlant de ces cellules souches, dont les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires. Dans ce modèle, les souris ayant la délétion de *Bmpr1a* démontrent des problèmes de régénération de l'épithélium intestinal associés avec un allongement du compartiment prolifératif des cellules souches et progénitrices. Cette augmentation de prolifération est aussi corrélée avec une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine et l'induction de polypose ressemblant à ce que l'on retrouve dans le syndrome JPS (He *et al.*, 2004).

Un peu plus tard, dans le laboratoire de la professeure Nathalie Perreault, une étude a démontré le rôle de *Bmpr1a* dans le compartiment épithélial seulement au niveau de l'homéostasie intestinale. Dans cette étude, la délétion du gène *Bmpr1a* fut effectuée grâce à l'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la *villine* qui permet une délétion strictement épithéliale, tout en laissant la signalisation intacte dans tous les autres compartiments cellulaires (Madison *et al.*, 2002). Le modèle murin est viable et ne mène pas à la formation de polypes au niveau du tube digestif. Les seuls phénotypes observés dans ces souris sont un allongement de l'axe crypte-villosité associé avec une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire. De plus, l'augmentation de prolifération n'est pas associée à une activation soutenue de la voie Wnt/ β -caténine contrairement aux résultats obtenus dans les études précédentes. Les souris possédant la délétion de *Bmpr1a* dans l'épithélium possèdent des modifications dans la différenciation terminale de la lignée sécrétrice (Auclair *et al.*, 2007). Les conclusions de cette étude démontrent que la délétion de la signalisation dans un seul compartiment cellulaire ne récapitule pas le phénotype de la délétion totale dans ce tissu, illustrant ainsi la contribution distincte de cette signalisation dans ces deux entités.

Dans cet ordre d'idées, un modèle murin a été généré afin de cibler la délétion conditionnelle de *BmprII*, le récepteur constitutivement actif de la signalisation des Bmps, dans le stroma uniquement. Cette délétion spécifique est effectuée grâce à l'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la *Nestine*. Cette étude démontre des résultats très similaires aux précédents avec une induction importante de polypes de types hamartomateux dans le côlon et associés à une augmentation de la prolifération dans le compartiment épithélial et mésenchymateux. Toutefois, les auteurs spécifient que la délétion par la Cre ciblait parfois quelques amas de cellules épithéliales ainsi que toutes les cellules du stroma, soit les myofibroblastes, les fibroblastes, les cellules musculaires et les cellules immunitaires (Beppu *et al.*, 2008). De cette façon, ce modèle démontre, encore une fois, l'importance de la signalisation des Bmps dans le JPS, tout en ciblant différentes combinaisons cellulaires pour la délétion que les études précédentes. Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer quels types cellulaires possèdent la contribution la plus importante dans ce phénotype. Ces évidences mettent l'accent sur l'importance de définir les contributions de l'épithélium et du mésenchyme dans la physiologie et les pathologies du tube digestif.

1.6.3 La signalisation des Bmps dans les pathologies intestinales

La signalisation des Bmps est surtout associée au syndrome de JPS. En fait, comme précédemment mentionné, les mutations retrouvées dans le gène *BMPRIA* sont présentes dans plus de 25% des cas et ce, encore plus fréquemment que celles du gène *SMAD4* (Brosens *et al.*, 2011; Zbuk et Eng, 2007). La protéine Smad4 est le Co-Smad appartenant aux deux signalisations, soit celles des Bmps et du TGF- β . Ces mutations sur le gène *SMAD4* peuvent ainsi affecter les deux signalisations. Dans le cas du JPS, les mutations retrouvées sont principalement au niveau mésenchymateux puisque les cellules épithéliales n'ont normalement pas de transformation (Brosens *et al.*, 2011). De plus, les différents modèles murins modifiant la signalisation des Bmps dans l'intestin, détaillés précédemment, ont amené des évidences claires de l'implication de la signalisation des Bmps dans le JPS. En effet, ces différents modèles murins développent des polypes de types hamartomateux possédant les mêmes caractéristiques

histologiques que celles retrouvées chez les patients atteints de JPS (He *et al.*, 2004) (Beppu *et al.*, 2008; Haramis *et al.*, 2004).

Les mutations de *Bmpr1a* retrouvées dans le JPS sont associées à un plus grand risque de développer un cancer colorectal. Toutefois, aucune mutation de gènes spécifiques aux Bmps n'a été trouvée dans ce type de cancer. Pour sa part, la signalisation du TGF- β est bien connue pour posséder des mutations qui sont reconnues dans le développement du cancer, comme les mutations du récepteur *TGFRII* et du Co-Smad *SMAD4*. Il est démontré que les mutations de *SMAD4* sont une étape importante dans le cancer colorectal et sont principalement associées à une dérégulation de la signalisation du TGF- β (Grady et Markowitz, 2002; Mundade *et al.*, 2014). Il ne faut pas oublier que ce Co-Smad participe également à la signalisation des Bmps et que cette dernière pourrait aussi avoir une influence sur l'initiation et la progression tumorale. Jusqu'à maintenant, très peu d'évidences claires ont démontré une dérégulation des éléments de la signalisation des Bmps dans le cancer colorectal. Une étude a évalué l'activité de la voie des Bmps en ciblant les phosphoSmad-1-5-8 nucléaires dans des biopsies d'adénomes et de carcinomes colorectaux. Les résultats démontrent une inactivation de la voie de signalisation des Bmps dans près de 70% des cancers. De plus, cette inactivation a lieu principalement dans la transition de l'adénome avancé vers le carcinome suggérant que la signalisation des Bmps pourrait contrôler la transition adénome-carcinome (Hardwick *et al.*, 2008). Considérant que la signalisation des Bmps est l'une des principales voies de signalisation associées au JPS, les mécanismes d'actions menant à la formation des polypes peuvent être des événements clés retrouvés dans le développement du cancer colorectal.

De façon similaire, au niveau des maladies inflammatoires intestinales, c'est principalement la signalisation du TGF- β qui est la plus étudiée. Le TGF- β est un morphogène, mais aussi une cytokine connue pour avoir de grands effets anti-inflammatoires. C'est probablement pour ces raisons qu'elle est grandement étudiée dans les maladies inflammatoires. En effet, une étude effectuée avec un modèle murin possédant un dominant négatif de *TGFRII* a démontré que ces souris étaient très

susceptibles à la colite chimique et possédaient des défauts importants de réparation (Beck *et al.*, 2003). Une autre étude s'affairant à caractériser la signalisation du TGF- β chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales ont démontré une surexpression de Smad7 et une diminution de Smad3, spécifique au TGF- β chez ces patients. Dans cette étude, les auteurs regardent uniquement la signalisation du TGF- β et concluent que Smad7 est surexprimé dans les maladies inflammatoires intestinales afin de diminuer la signalisation du TGF- β et maintenir la production de cytokines pro-inflammatoires (Monteleone, Giovanni *et al.*, 2001). Smad7 est un inhibiteur de la superfamille du TGF- β qui se lie au récepteur de type I. Il est aussi capable de lier le récepteur Bmpr1a, ceci indique une possibilité que cette signalisation soit aussi affectée dans les maladies inflammatoires intestinales. Très peu d'études se sont concentrées à démontrer un rôle de la signalisation des Bmps dans ces maladies. Une étude, parue en 2003, a utilisé l'injection prophylactique ou thérapeutique du ligand Bmp7 dans le côlon de rats ayant subi une colite chimique. Les deux traitements ont permis d'améliorer grandement les signes cliniques ainsi que d'accélérer la réparation de l'épithélium (Maric *et al.*, 2003). Bmp7 active la signalisation des Bmps, ceci suggère donc que cette signalisation pourrait avoir des potentiels bénéfiques dans le cadre des maladies inflammatoires intestinales.

Jusqu'à maintenant, les études sur les Bmps au niveau de l'intestin se sont principalement concentrées à démontrer ses rôles dans le développement et l'homéostasie du tube digestif ainsi que dans la pathogénèse du JPS et de la polypose. Toutefois, plusieurs travaux restent encore à être effectués afin de déterminer quels types cellulaires devraient être primordialement ciblés dans le traitement du JPS. De plus, les différentes combinaisons de ligands et d'effecteurs, spécifiques à la signalisation des Bmps, démontrent des effets hétérogènes que peut avoir cette signalisation. L'étude des différents ligands et des effecteurs spécifiques va permettre de mieux comprendre les rôles importants que comporte la signalisation des Bmps dans l'intestin.

1.7 Hypothèse et objectifs du volet 1 : *Smad5* épithélial

La signalisation des Bmps possède plusieurs rôles importants au niveau de l'embryogenèse, de l'homéostasie et de plusieurs pathologies chez l'humain. Concrètement, au niveau de l'intestin et du côlon, cette signalisation est essentielle au maintien des interactions épithéliaux-mésenchymateuses nécessaires dans le développement ainsi que pour l'homéostasie de ces tissus. Chez la souris, la délétion totale des différents effecteurs *Smad1* et *Smad5* amène des phénotypes différents selon l'effecteur ciblé leur suggérant des rôles distincts. De ces deux modèles, la souris mutante pour *Smad5* est la seule qui possède des défauts dans les tissus primitifs formant l'intestin, lui démontrant un rôle important dans le développement de ce tissu. De façon plus spécifique, la perte du récepteur *Bmpr1a* uniquement dans l'épithélium intestinal mène à une dérégulation de la prolifération et un problème de différenciation des cellules épithéliales. La signalisation des Bmps possède différentes implications sur la muqueuse intestinale, mais les mécanismes d'actions sont encore inconnus. Cette signalisation passe par trois différents effecteurs qui semblent avoir des rôles distincts. Pour mieux comprendre son implication dans le développement et l'homéostasie intestinale, il est essentiel de décortiquer le rôle distinct que pourrait avoir chacun de ces effecteurs.

Hypothèse : L'effecteur *Smad5*, dans les cellules épithéliales intestinales, possède des rôles spécifiques pour réguler quelques unes des fonctions associées à la signalisation des Bmps. Pour répondre à cette hypothèse, j'ai utilisé un modèle de délétion conditionnelle du gène *Smad5* dans les cellules épithéliales intestinales et coliques seulement, grâce à l'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *villine*. Je me suis fixée deux objectifs clairs pour structurer l'évolution des mes travaux.

Objectif 1 : Déterminer l'effet de la délétion de *Smad5* dans les cellules épithéliales intestinales sur l'homéostasie de l'intestin et du côlon.

Objectif 2 : Déterminer si cet effecteur contrôle des fonctions importantes dans l'inflammation intestinale.

1.8 Hypothèse et objectifs du volet 2 : *Bmpr1a* mésenchyme

La délétion totale de la signalisation des Bmps spécifiquement dans l'intestin amène une inhibition de la prolifération des cellules épithéliales associée à une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine. Cette dérégulation mène à un phénomène de polypose ressemblant grandement à celui retrouvé dans le syndrome de JPS. Pour sa part, la délétion strictement épithéliale du récepteur *Bmpr1a* cause un allongement de l'axe crypte-villosité et une augmentation de la prolifération cellulaire sans causer d'induction de polypose. Cette dichotomie entre les résultats obtenus dans ces diverses études semblent suggérer que différents types cellulaires, autres que les cellules épithéliales, pourraient être responsables de l'initiation de la polypose. Dans le syndrome de JPS, les mutations du gène *BMPRIA* sont fréquemment associées à cette pathologie. De plus, les études chez les patients atteints de JPS suggèrent une implication importante du mésenchyme dans cette polypose, ce qui est appuyé par une proportion plus grande de mutations dans le gène *BMPRIA* dans le compartiment mésenchymateux. Toutes ces évidences semblent mettre de l'avant le mésenchyme dans ces différents phénomènes.

Hypothèse : La signalisation des Bmps dans le compartiment mésenchymateux est responsable de l'initiation de la polypose contrairement à celle du compartiment épithélial.

Pour répondre à cette hypothèse, j'ai utilisé un modèle de délétion conditionnelle du gène *Bmpr1a* dans le mésenchyme seulement, grâce à l'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Foxl1*. Je me suis fixée deux objectifs clairs pour structurer l'évolution de mes travaux.

Objectif 1 : Déterminer l'effet de la délétion de *Bmpr1a*, dans le mésenchyme colique, sur l'homéostasie et la polypose du côlon.

Objectif 2 : Déterminer les modifications engendrées par la perte de *Bmpr1a* mésenchymateux dans la muqueuse colique.

1.9 Hypothèse et objectif du volet 3 : Modèle in vitro pour Bmpr1a mésenchyme

Les résultats obtenus dans l'étude effectuée dans le cadre du volet 2 suggèrent des rôles importants de la signalisation des Bmps myofibroblastique dans l'homéostasie du côlon. La faible proportion cellulaire représentée par les myofibroblastes par rapport au reste des cellules du côlon empêche les investigations spécifiques au niveau des cellules inhibées pour la signalisation des Bmps dans les souris utilisées pour le deuxième volet. Les phénotypes importants obtenus avec ce modèle murin, malgré la faible proportion de cellules ciblées, démontrent l'importance de comprendre le rôle de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes. De plus les mécanismes d'actions et les gènes cibles expliquant la biodiversité des effets de cette signalisation sont encore inconnus. Il est donc nécessaire d'investiguer de façon plus concrète les mécanismes d'actions dirigés par cette signalisation dans les myofibroblastes.

Hypothèse : La signalisation de Bmps est responsable de contrôler le comportement et la différenciation dans les myofibroblastes.

Pour répondre à cette hypothèse, j'ai utilisé la lignée cellulaire de myofibroblastes humains coliques, les CCD-18Co, dans laquelle la signalisation des Bmps fut inhibée. Je me suis fixée l'objectif suivant :

Objectif 1 : Déterminer les modifications du profil transcriptionnel des myofibroblastes suivant l'inhibition de la signalisation des Bmps.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Procédures impliquant des animaux

Dans le cadre des différents projets, plusieurs lignées de souris ont été utilisées et maintenues dans l'unité de souris transgéniques de façon conforme aux normes du comité d'éthique animal de l'université de Sherbrooke et du conseil canadien de protection animal (CCPA). Les souris C57BL/6-*Smad5*^{loxP/loxP} proviennent du Dr Zwijsen (Chang, H. *et al.*, 1999), les souris C57BL/6-*Bmpr1a*^{loxP/loxP} du Dr Mishina (Mishina *et al.*, 1995), les souris transgéniques C57BL/6-12.4Kb *Villine*Cre du Dr Gumucio et les souris transgéniques C57BL/6-*FoxL1*Cre du Dr Kaestner (Sackett *et al.*, 2007). Pour mener à terme les projets de recherche, des croisements entre ces lignées de souris ont été réalisés. Tout d'abord, les souris *Smad5*^{loxP/loxP} ont été croisées avec les souris *villine/Cre* (Madison *et al.*, 2002) pour générer les souris *Smad5*^{loxP/+}; *villine/Cre* qui ont été par la suite croisées avec les souris *Smad5*^{loxP/loxP} pour générer des souris expérimentales *Smad5*^{loxP/loxP}; *villine/Cre* (*Smad5*^{ΔCEI}) et leurs contrôles. Pour les expériences effectuées sur le projet *Smad5*, les paires de souris, *Smad5*^{ΔCEI}) et leurs contrôles, étaient du même sexe et du même âge, soit entre 90 et 120 jours. De façon similaire, les souris expérimentales *Bmpr1a*^{loxP/loxP}; *Foxl1/Cre* (*Bmpr1a*^{ΔMes}) ont été générées en croisant, tout d'abord, les souris *Bmpr1a*^{loxP/loxP} avec les souris *Foxl1/Cre* pour produire les souris *Bmpr1a*^{loxP/+}; *Foxl1/Cre* qui ont été à leur tour croisées avec les souris *Bmpr1a*^{loxP/loxP} pour générer les souris expérimentales *Bmpr1a*^{ΔMes} et leurs contrôles. Pour les expériences effectuées sur le projet *Bmpr1a*, les paires de souris utilisées, *Smad5*^{ΔCEI}) et leurs contrôles, étaient du même sexe et du même âge, soit entre 90 et 365 jours. Le tableau 1 représente les différents croisements effectués pour obtenir les différentes lignées de souris expérimentales et contrôles.

Tableau 1. Croisements des lignées de souris

| Croisement | Source génique | Génotype | Ratio mendélien |
|--|----------------|---|-----------------|
| <i>Smad5</i> ^{loxP/loxP} x <i>Villine</i> /Cre | C57BL/6 | <i>Smad5</i> ^{loxP/+} ; <i>Villine</i> /Cre | 50% |
| <i>Smad5</i> ^{loxP/+} ; <i>Villine</i> /Cre x <i>Smad5</i> ^{loxP/loxP} | C57BL/6 | <i>Smad5</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Villine</i> /Cre | 25% |
| <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/loxP} x <i>Foxl1</i> /Cre | C57BL/6 | <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/+} ; <i>Foxl1</i> /Cre | 50% |
| <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/+} ; <i>Foxl1</i> /Cre x <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/loxP} | C57BL/6 | <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Foxl1</i> /Cre | 25% |

2.2 Génotypage des animaux

Pour permettre le génotypage et l'identification des souriceaux en bas âge, un de leurs orteils est coupé, entre la 4^e et la 10^e journée suivant leur naissance. En plus de servir à l'identification, l'ADN génomique est extrait de l'orteil coupé afin de permettre le génotypage par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les orteils sont mis dans 75µL de solution de NaOH (25mM) EDTA (0.2mM) à 95°C durant une heure. La solution est ensuite tempérée et neutralisée avec 75µL d'une solution de Tris-HCl (40mM) à pH 5.5. Les solutions sont par la suite centrifugées à 4000rpm pour 3 min pour culoter les poils et les autres débris retrouvés dans la solution. Par la suite, les PCR sont effectués sur ces solutions d'ADN génomique avec des amorces spécifiques pour permettre la détection des allèles associés au génotype. La réaction de PCR se fait avec 2 µL de tampon d'amplification (3,73 g de KCl, 0,31 g de MgCl₂, 10mL de Tris-Cl (100 mM pH 8) dans 100 mL total), 1µL d'ADN génomique spécifique pour chaque souris, 0,2µL (1 unité) d'enzyme d'amplification, 1µL de chacune des amorces spécifiques (Tableau 2) diluées à 10 mM (IDT Technology, Coralville, IA, USA) et 0,2 µL de dNTPs (2.5mM, Invitrogen) avant de compléter à 20 µL avec de l'eau stérile. Pour chacune des paires d'amorces utilisées, une température d'appariement spécifique est utilisée pour nous permettre d'obtenir des produits de PCR désirés afin de déterminer le génotype de chacune des souris tel que représenté dans le tableau 2. La visualisation des produits de PCR est effectuée par

une migration sur gel d'agarose 1,5% (p/v) (Roche, Indianapolis, IN, USA) à 110 volt pendant 25 minutes.

Tableau 2. Amorces utilisées pour le géotypage par PCR

| Géotypage | Amorces utilisées | T°app. | Nb cycles | Taille du produit |
|---|---|--------|-----------|---|
| <i>Foxl1</i> /Cre et <i>Villine</i> /Cre | 5'- GCG GCA TGG TGC AAG TTG AAT -3' | 55 | 30 | 255 pb |
| | 5'- CGT TCA CCG GCA TCA ACG TTT -3' | | | |
| <i>Bmpr1a</i> ^{loxP/loxP} | 5'- GCA GCT GCT GCT GCA GCC TCC-3' | 64 | 40 | 230pb (allèle loxP) 150pb (allèle sauvage) |
| | 5'-TGG CTA CAA TTT GTC TCA TGC-3' | | | |
| <i>Smad5</i> ^{loxP/loxP} | 5'- GAG CGT CTT CCT TAG CTA ATG TG -3' | 59 | 35 | 350pb (allèle loxP) 255pb (allèle sauvage) |
| | 5'-TCG GAA CCA AAT AGT TCA CTG -3' | | | |

2.3 Induction d'une colite chimique

La colite chimique est induite à l'aide du détergent dextran sulfate de sodium (DSS MW 36 000-50 000, MP Biomedicals, Illkrich, France) dilué dans l'eau de boisson des animaux. Pour ce faire, des souris âgées d'environ 90 jours reçoivent une solution de DSS 3% (p/v) pour une durée de 2, 4 ou 7 jours. Les signes cliniques de colite sont ensuite évalués à chaque jour du traitement au DSS ainsi qu'au jour du sacrifice (voir section 2.4). Pour les expérimentations de DSS aiguës comparant des animaux *Smad5*^{ΔCEI} et leurs contrôles, ainsi que les souris sauvages CD1, le protocole mentionné ci-haut était utilisé. De plus, dans le cas de l'expérimentation de récupération, les *Smad5*^{ΔCEI} et leurs contrôles reçoivent une solution de DSS 3% (p/v) pour 7 jours consécutifs, suivi d'une période de récupération de 5 jours avec de l'eau seulement. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale qui était précédée par une injection intramusculaire de kétamine (voir section 2.6)

pour permettre les prélèvements de tissus.

2.4 Évaluation des signes cliniques de la colite

Les signes cliniques de colite ont été évalués à chaque jour de l'expérimentation ainsi qu'au sacrifice par le même expérimentateur. Quatre critères sont évalués et une note de 0 à 4 leur est attribuée (Tableau 3). L'index d'activité de la maladie (DAI, *Disease Activity Index*) représente la moyenne de ces 4 critères, adapté de Cooper *et al.*, (Cooper *et al.*, 1993).

Tableau 3. Évaluation des signes cliniques de la colite

| | |
|-------------------------------|--|
| Perte de poids | 0 = pas de perte de poids 1 = 1-5% de perte de poids 2 = 6-10% de perte de poids 3 = 11-15% de perte de poids 4 = 16-20% de perte de poids |
| Consistance des selles | 0 = selles normales 2 = selles molles et adhérentes à l'anus 4 = diarrhée sévère et côlon souvent vide au sacrifice |
| Sang dans les selles | 0 = aucune trace de sang 2 = selles légèrement colorées 4 = selles fortement colorées |
| Saignement rectal | 0 = pas de saignement 2 = saignement modéré 4 = saignement évident |
| Dureté du côlon | 0 = dureté normal 1 = 25% atteint (gonflé) 2 = 50% atteint 3 = 75% 4 = 100% |
| Longueur du côlon | 0 = 100-96% 1 = 95-86% |

| | |
|--|------------|
| | 2 = 85-76% |
| | 3 = 75-66% |
| | 4 = < 65% |

2.5 Incorporation au 5-bromo-2'-déoxyuridine

Afin de visualiser la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal et colique à l'aide du 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), une incorporation de cet agent est nécessaire 90 minutes avant le sacrifice. Les souris reçoivent une injection intra-péritonéale de 10µL par gramme de poids corporel d'une solution contenant le BrdU (*BrdU labeling reagent*, Invitrogen, Frederick, MD, USA). Cette injection est effectuée 90 minutes avant le sacrifice pour visualiser la prolifération et 12 heures ou 48 heures avant le sacrifice pour visualiser la migration au niveau du côlon et de l'intestin respectivement.

2.6 Euthanasie des souris

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale sous anesthésie grâce à une injection intramusculaire de 1µL par gramme de poids corporel d'un mélange de chlorhydrate de kétamine (100mg/mL) – xylazine (13mg/ml) (Wyeth, Guelph, ON). Le tube digestif est prélevé et segmenté selon les régions spécifiques du tube digestif soit l'estomac, l'intestin grêle avec ses trois sections, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et finalement le côlon. L'intestin et le côlon sont les principaux tissus récoltés pour mon projet de doctorat. Les prélèvements ont été effectués sur une plaque de verre froide pour ralentir la dégradation du tissu. Dépendamment des expérimentations à effectuer, les tissus peuvent être préservés pour des études histologiques (Section 2.12), pour l'extraction d'ARN (section 2.25) et/ou l'extraction de protéines (Section 2.22).

2.7 Évaluation macroscopique des tissus

À chacun des sacrifices, des évaluations macroscopiques des organes ont été effectuées afin de répertorier les observations pouvant être associées au phénotype. Dans ces méthodes d'évaluation, on retrouve la prise du poids de plusieurs organes (rate et estomac)

ainsi que la mesure de la longueur de l'intestin et du côlon. De plus, certaines observations macroscopiques ont été prises en photo par le photographe de la FMSS, Robert Dumont.

Pour évaluer s'il y avait apparition de polypose, le nombre de polypes est compté chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} et contrôles âgées de 1 an. Le tube digestif est segmenté selon chacune des sections, de l'estomac au rectum. Les segments sont ouverts longitudinalement et rincé dans le PBS 1X afin de retirer les résidus de nourritures ou de selles. Les tissus sont colorés avec une solution de bleu de méthylène à 1% (p/v) afin de faire contraster la muqueuse et les polypes sont comptés à l'aide d'un microscope à dissection Leica MS5 (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada).

2.8 MatriSpersé : dissociation de l'épithélium et du mésenchyme

L'épithélium et le mésenchyme des jéjunums et des côlons, pour les souris *Smad5*^{ΔCEI} et *Bmpr1a*^{ΔMES} respectivement, ont été séparés par l'adaptation de la méthode de dissociation utilisant le MatriSpersé (Perreault et Beaulieu, 1998). Brièvement, après le sacrifice des souris, les tissus sont ouverts longitudinalement et séparés en sections. Chaque section est rincée dans le PBS 1X froid et est coupée en de petits morceaux de 5mm. Les morceaux sont placés dans des tubes Falcons de 15ml et incubés avec un volume de 5 ml de solution de MatriSpersé (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) à 4°C pendant 18h (pour le jéjunum) ou 24 heures (pour le côlon). Après cette incubation, la couche d'épithélium se dissocie facilement avec une légère agitation manuelle. La suspension de cellules épithéliales est recueillie, centrifugée et lavée dans les PBS froid avant d'être resuspendue dans le tampon approprié pour les utilisations futures, soit pour l'extractions d'ADN ou d'ARN. La fraction restante représente un enrichissement du mésenchyme qui est aussi lavée et resuspendue dans le tampon approprié.

2.9 Extraction d'ADN génomique sur colonne et validation de la recombinaison

Les ADN génomiques sont extraits des épithéliums et mésenchymes isolés des côlons des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Pour réussir l'extraction du l'ADN génomique de ces fractions, la trousse *Qiagen DNAeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, MD USA) est utilisée

en suivant les recommandations du manufacturier.

Par la suite, les PCR sont effectués sur ces échantillons d'ADN génomique avec des amorces spécifiques pour permettre la détection de la recombinaison des allèles de *Bmpr1a* dans les fractions mésenchymateuses. La recombinaison du gène par la Cre recombinase s'effectue entre les deux sites loxP et elle est visualisable par l'amplification en PCR d'une bande spécifique de 180pb en utilisant des amorces spécifiques (5'-GGTTTGGATCTTAACCTTAGG-3' et 5'- TGGCTACAATTTGTCTCATGC-3') (IDT Technology, IA, USA).

2.10 Fixation des tissus

Suite au prélèvement, les tissus sont placés dans des histo-cassettes et incubés à 4°C toute la nuit (14 à 18 heures) dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% (p/v) (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA). Après l'incubation, les histo-cassettes sont rincées deux fois avec de l'éthanol 70% (v/v) (Commercial Alcohols, Brampton, On, Canada) et elles sont conservées à 4°C dans cette solution d'alcool jusqu'au moment de leur circulation pour l'inclusion par la plateforme de phénotypage animal de la FMSS.

2.11 Microscopie électronique

Les tissus destinés à l'analyse en microscopie électronique ont été fixés avec 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 à 4°C durant un minimum de 24 heures. Les tissus sont ensuite envoyés à la plateforme d'histologie et microscopie électronique de la FMSS où le reste de la procédure a été effectuée. Brièvement, après deux rinçages avec un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4, les échantillons sont incubés dans une solution de 1 % (p/v) de tétroxyde d'osmium dans un tampon cacodylate pendant 90 minutes. Le tissu est déshydraté en utilisant des concentrations croissantes d'éthanol (70, 85, 95 et 100 % (v/v)) et d'oxyde de propylène. Il est ensuite infiltré dans de la résine Epon 812 qui est laissée à 60°C pendant 48 heures pour polymériser. Des coupes minces (de 80 nm) sont préparées en utilisant un ultramicrotome Leica Ultracut UCT (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada), en contraste avec du citrate de plomb et de l'acétate d'uranyle. Les coupes sont observées au microscope électronique à transmission Hitachi H-7500 (Hitachi, Schaumburg, IL, USA).

2.12 Circulation et coupes histologiques

La circulation permet d'enlever l'eau restante dans les tissus et de les remplir de paraffine pour permettre leur coupe subséquente. Les différentes étapes de la circulation ainsi que les solutions et les périodes d'incubation sont décrites dans le tableau 4. Les tissus sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine selon des orientations très spécifiques à chaque tissu afin d'améliorer les coupes. Les coupes histologiques de 5 microns d'épaisseurs sont effectuées sur ces blocs de paraffine à l'aide d'un microtome Shandon Finesse ME + (Thermo Electro Corporation, USA) et sont placées directement sur des lames chargées Fisherbrand (Fisher Scientific).

Tableau 4. Étape de circulation des tissus

| Étapes | Solution | Durée et répétitions |
|--------|--------------------|--|
| 1 | Éthanol 70% (v/v) | 10 min, 6 fois |
| 2 | Éthanol 95% (v/v) | 10 min, 3 fois |
| 3 | Éthanol 100% (v/v) | 10 min, 3 fois + 20 min, 3 fois |
| 4 | Xylène | 1 heure, 1 fois + 14 à 18 heures, 1 fois |
| 5 | Paraffine 75°C | 1 heure, 3 fois |

2.13 Inclusion et coupe en O.C.T.

Certaines immunofluorescences nécessitent une inclusion en O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*) et fixation plus tardive plutôt qu'une fixation au PFA et inclusion en paraffine comme décrit précédemment. Dans ces cas, après être prélevés des souris, les tissus sont lavés au PBS 1X et ensuite directement placés dans une solution d'O.C.T. compound (Tissue-TEK 4583, Marivac, Gore, Qc, Canada). Cette solution est un mélange de résine de glycols qui permet de conserver les tissus tout en les gelant graduellement et en empêchant la formation de cristaux. Une fois dans l'O.C.T., les blocs sont congelés par contact indirect avec l'azote liquide. Les coupes des blocs d'O.C.T. se font avec un cryostat Leica CM3050 (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada) et sont d'une épaisseur de 5 microns qui sont placées directement sur des lames chargées Fisherbrand

(Fisher Scientific), tout comme les coupes en paraffines. Les blocs et les lames sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

2.14 Immunofluorescence sur les coupes en paraffine

Les tissus utilisés pour les tests en immunofluorescence proviennent des coupes histologiques décrites dans la section 2.12. Les lames doivent d'abord subir les étapes de déparaffinage et de réhydratation. Pour ce faire, les lames sont d'abord chauffées 15 minutes à 60°C puis trempées dans le xylène 100% (Fisher Scientific) 2 fois 5 minutes. Ensuite, elles sont trempées successivement dans une solution d'éthanol 100 % (Commercial Alcohols, Brampton, On, Canada) 2 fois 2 minutes, d'éthanol 95 % 2 fois 1 minute, d'éthanol 80 % 1 fois 1 minute et finalement dans une solution d'éthanol 70% 1 fois 1 minute. Après cette étape de déparaffinage, les lames sont rincées dans l'eau pour 1 minute avant de passer à l'étape de recouvrement des antigènes/épitopes par immersion dans 650mL d'acide citrique pH 6.0 (Tampon sodium citrate 10mM, Fisher Scientific) qui doit être en ébullition pendant 6 minutes. Les lames sont laissées dans ce tampon jusqu'à ce qu'elles tempèrent et elles sont rincées dans l'eau courante pour 10 minutes. Avant de passer à l'étape du blocage des sites non-spécifiques, les lames sont trempées dans du PBS 1x pour 5 minutes. Ensuite, des cercles hydrophobes sont dessinés sur les lames, autour des tissus, afin de permettre de restreindre la zone qui recevra les solutions de blocage et d'anticorps. Le blocage des sites non-spécifiques s'effectue avec une solution de blocage PBT (PBS 1X, BSA 2% (p/v) (Roche, Indianapolis, IN, USA), Triton X-100 0,1 % (Fisher Scientific)) pour 30 minutes dans une chambre humide à la température de la pièce. Après cette étape, la solution de blocage est enlevée de sur les lames et on y dépose la solution de blocage (PBT) contenant la dilution d'anticorps. Comme chacun des anticorps possèdent des conditions spécifiques, le tableau 5 permet de visualiser les conditions spécifiques à chacun des anticorps. L'incubation avec les anticorps s'effectue dans une chambre humide, à 4°C pour une période de 14 à 18 heures. À la suite de cette incubation, les lames sont rincées dans du PBS 1X pour deux périodes de cinq minutes. De façon similaire, les anticorps secondaires couplé à des fluorophores (Tableau 5) sont dilués dans la solution de blocage (PBT) précédemment utilisée. Les tissus sont placés en incubation avec la solution d'anticorps secondaire pour une période de 1 heure 30 minutes à température ambiante,

dans une chambre humide à l'abri de la lumière. Après cette étape, les lames sont rincées dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Ensuite, certaine contre-coloration peuvent être effectuées pour permettre une meilleure visualisation du tissu ou des noyaux cellulaires lors de la prise de photo. La contre-coloration au bleu d'Evans (Fisher Scientific) dilué 0.1 % (p/v) dans du PBS 1X est effectuée en immergeant les lames dans cette solution pour 30 secondes. De façon similaire, la coloration au DAPI (Sigma-Aldrich, St-Louis, MA, USA), dilué 1 :10000 dans le PBS 1X, permet de visualiser les noyaux et elle est effectuée en immergeant les lames dans cette solution pour une période de 5 minutes. Après ces contre-colorations, les lames sont rincées dans du PBS 1X, au moins 3 fois 5 minutes avant d'être trempées rapidement dans l'eau pour enlever les traces de sels et être mises à sécher sous la hotte. Une fois séchées, les lames sont montées avec des lamelles en verre (VWR, West Chester, PA, USA) et du milieu de montage pour immunofluorescence *Vectashield Hard set* (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) permettant de recouvrir les tissus et préserver la qualité des fluorophores. L'analyse des immunofluorescences et la prise d'images s'effectuent grâce à un microscope à fluorescence Leica DM LB2 (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada) possédant des filtres spécifiques pour chacune des longueurs d'ondes utilisées avec les différents fluorophores.

Tableau 5. Conditions des anticorps utilisés en immunofluorescence

| | Antigène reconnu | Dilutions | Sources animales | # anticorps, Compagnie |
|----------------------------|-------------------------|------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Anticorps primaires | BrdU | 1 :50 | Aucune – Précouplé FITC | #BMC 9318, Roche Diagnostic |
| | E-cadhérine | 1 :1000 | Souris | #C20820, BD Transduction |
| | β -caténine | 1 :1000 | Lapin | #9587, Cell Signaling |
| | CD45R/B220 | 1 :100 | Rat | #14-0452, eBioscience |
| | Collagène I | 1 :200 | Lapin | #PA1-85319, Thermo Scientific |
| | Collagène IV | 1 :500 | Lapin | #AB756P, Chemicon International |

| | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|---------|--------|--------------------------------|
| | Fibronectine | 1 :1000 | Lapin | #AB2033, Millipore |
| | PCNA | 1 :100 | Lapin | #ab18197, Abcam |
| | α -SMA | 1 :5000 | Souris | #A2547, Sigma |
| | Phospho-Smad1-5-8 | 1 :500 | Lapin | #sc-12353, Santa Cruz |
| | Vimentine | 1 :100 | Lapin | #5741, Cell Signaling |
| Anticorps secondaires | IgG lapin (couplé FITC) | 1:300 | Chèvre | # FI-1000, Vector Laboratories |
| | IgG souris (couplé FITC) | 1:300 | Cheval | # FI-2000, Vector Laboratories |
| | IgG souris (couplé Alexa-568) | 1:400 | Chèvre | # A-11004, Invitrogen |

2.15 Coloration à l'Hématoxyline et Éosine

La coloration à l'hématoxyline et éosine (H&E) est utile pour mettre en évidence les structures morphologiques d'un tissu. L'hématoxyline (Harris-Hematoxylin, Protocol, Fisher Scientific Corporation, Kalamazoo, MI, USA) permet de lier des résidus lysine sur les histones permettant de colorer les noyaux des cellules en bleu. L'éosine (Eosin, Protocol, Fisher Scientific Corporation) se liant, grâce aux forces électrostatiques, aux régions acidophiles va permettre de colorer en rose le cytoplasme des cellules. Les colorations H&E sont effectuées sur les tissus provenant des coupes histologiques en paraffine décrites dans la section 2.12. Les lames ont été déparaffinées et réhydratées comme décrit dans la section 2.14. Les lames sont ensuite mises 1 minute sous l'eau courante dans un petit bac. Puis, elles sont plongées dans l'eau distillée pour 1 minute. Les lames sont ensuite mises dans l'hématoxyline de Harris pour 1 minute. Les lames sont rincées à l'eau courante 1 minute. Elles sont ensuite déposées dans une solution d'eau acide (1 % HCl dans de l'eau distillée) pendant 1 minute et ensuite rincées à l'eau courante durant 1 minute. Cette dernière étape permet d'enlever l'ensemble l'hématoxyline non spécifiquement lié. De la même manière, les lames sont trempées dans l'eau ammoniacale (1 ml d'ammoniaque dans 1 litre d'eau) durant 1 minute et rincées à l'eau courante pour 1 minute. Cette étape permet à l'hématoxyline de reprendre sa teinte bleutée. Les lames sont

ensuite rincées 2 fois 1 minute dans l'éthanol 100 %. Finalement, les lames sont mises dans l'éosine 0,25 % pendant 1 minute. Les lames sont ensuite trempées de façon successive 3 fois 1 minute dans l'éthanol 100 % et 2 fois 1 minute dans le xylène. Ensuite, les lames ont été montées avec une goutte de *Vectamount* (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) et recouvertes d'une lamelle à microscopie en verre (VWR, West Chester, PA, USA). Par la suite, elles ont séchées durant 24 heures sous la hotte chimique et elles ont été analysées par un scanner multi-lames à lumière visible (Nanozoomer, Hamamatsu, Japon)

2.16 Coloration à l'alcian bleu

Une coloration à l'alcian bleu permet de marquer les cellules caliciformes produisant des mucines acides. Les tissus utilisés pour l'alcian bleu proviennent des coupes histologiques décrites dans la section 2.12. Les lames sont ensuite déparaffinées et réhydratées comme décrit dans la section 2.14, mais cette fois, les épitopes sont révélés avec une solution d'acide acétique 3 % (Fisher Scientific) durant 3 minutes. À ce stade, l'acide acétique est enlevée et remplacée par la solution d'alcian bleu 1 % (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA) pour 30 minutes. Par la suite, les lames sont lavées 10 minutes à l'eau courante dans un bécher. Une contre coloration est effectuée en mettant du Nuclear Fast Red 0,1 % (Poly Scientific) pour 40 secondes avant de laver de nouveau sous l'eau courante. Enfin, les lames sont déshydratées. Elles sont trempées 1 minute dans l'éthanol 70 % suivi de 2 minutes dans l'éthanol 95 %, 2 minutes dans l'éthanol 100% et finalement 5 minutes dans le Xylène 100 % (Fisher Scientific). Les lames sont séchées sous la hotte durant 18 heures et plus. Ensuite, les lames sont montées avec une goutte de *Vectamount* (Vector laboratories), recouvertes d'une lamelle pour microscopie en verre (VWR). Elles sont analysées par un scanner multi-lames à lumières visibles (Nanozoomer)

2.17 Coloration Trichrome de Masson

La coloration Trichrome de Masson permet de visualiser, en bleu, les fibres de collagènes présentes dans un tissu. Les lames en paraffines sont utilisées pour cette coloration et doivent être déparaffinées et réhydratées comme à la section 2.12. Par la suite, les lames sont placées en contact avec une solution de Bouin (HT-10-1, Sigma-Aldrich)

pour 15 minutes à 56°C. La solution de Bouin est enlevée par un rinçage dans l'eau courante pour 5 minutes et ensuite 2 minutes dans l'eau distillée. Les lames sont trempées dans une solution de Scalart Acid Fushin (HT-15-1, Sigma-Aldrich) pour 5 minutes à température ambiante avant d'être rincées rapidement dans l'eau distillée. Les lames sont ensuite mises en contact avec la solution 1:1 d'acide phosphotungstic et d'acide phosphomolybdic pour 5 minutes et directement dans la solution d'Aniline Bleu (HT-15-4, Sigma-Aldrich) pour 5 minutes. Pour terminer et contraster la coloration, les lames sont trempées dans une solution d'acide acétique 1% (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA) avant d'être déshydratées comme à la section 2.11. Elles sont ensuite recouvertes d'une lamelle à microscopie en verre avec une goutte de *Vectamount* (Vector laboratories) et analysées par un scanner multi-lames à lumières visibles Nanozoomer.

2.18 Immunohistochimie sur les coupes histologiques

Les tissus utilisés pour des tests en immunohistochimie ont suivi les étapes de réhydratation et révélation des épitopes pour les immunofluorescences (voir section 2.12). Avant d'effectuer le blocage des sites non spécifiques, les lames ont été traitées afin de bloquer les peroxydases endogènes, soit en mettant en contact le tissu avec du *peroxidase block* (K4007/K4011, Dako, Carpinteria, CA, USA) durant 5 minutes à température ambiante dans une chambre humide. Ensuite les sites non spécifiques ont été bloqués comme pour une immunofluorescence (section 2.14) avec une solution de PBT. Chaque anticorps possède ses propres dilutions, les détails sont illustrés dans le tableau 6. Les lames sont par la suite lavées 2 fois dans du PBS 1X avant de les mettre en contact avec l'anticorps secondaire couplé avec l'enzyme HRP pré-diluée (anti-souris K4007 ou anti-lapin K4011, Dako) pour 1 heure 30 minutes à température ambiante dans la chambre humide. La révélation se fait sous un binoculaire (Leica MZFL III, Concorde, On, Canada) où l'on met 200 µL d'une solution de DAB+ (K4007/K4011, Dako) durant un temps fixe pour révéler toutes les lames dans les mêmes conditions. La réaction est arrêtée en trempant les lames dans l'eau distillée. Une contre coloration avec une solution d'hématoxyline (Mayer's Hematoxylin, Dako) a été effectuée, en appliquant celle-ci durant 40 secondes, rincée à l'eau du robinet 10 minutes, traité à l'alcool acide (1 % HCl dans de l'éthanol 70 %) 30 secondes et rincée à l'eau du robinet durant une minute. Finalement, les tissus ont été

traités à l'eau ammoniacale (1 ml d'ammoniaque dans 1 litre d'eau) pour 40 secondes et rincées à l'eau du robinet 1 minute. Les lames sont ensuite déshydratées, par des trempages séquentiels de 1 minute dans l'éthanol 70 %, 2 minutes dans éthanol 95 %, 2 minutes dans l'éthanol 100 % et finalement 5 minutes dans le xylène 100 % (Fisher Scientific). Les lames ont été séchées sous la hotte durant 18 heures et plus. Les lames ont été montées avec une goutte de *Vectamount* (Vector laboratories) et analysées par un scanner multi-lames à lumières visibles Nanozoomer.

2.19 Score histologique de la colite

L'évaluation du score histologique de la colite s'effectue sur les colorations H&E des lames en paraffine de côlons provenant des souris traitées au DSS (section 2.12 et 2.14). Trois critères sont évalués et une note de 0 à 4 leur est attribuée (Tableau 6). Le score histologique de la colite représente la somme de ces trois critères, adapté de Dieleman *et al.*, (Dieleman *et al.*, 1996). Le score histologique représente la compilation des scores obtenus de deux observateurs indépendants, effectué sur un minimum de 12 champs par coloration de H&E pour chaque individu analysé.

Tableau 6. Score histologique de la colite

| | |
|-----------------------------------|---|
| Sévérité de l'inflammation | 0 = Aucune inflammation 1 = légère 2 = modérée 3 = sévère |
| Étendue de l'inflammation | 0 = Aucune inflammation 1 = muqueuse 2 = muqueuse et sous-muqueuse 3 = transmurale |
| Domages aux cryptes | 0 = Aucun dommage 1 = premier tiers de la base de la crypte 2 = deux tiers de la base de la crypte 3 = toute la crypte (seulement l'épithélium de surface restant) 4 = Aucun épithélium restant |

2.20 Essai TUNEL

L'apoptose est évaluée grâce à l'essai TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, (Roche diagnostic, Indianapolis, IN, USA)) effectué par immunofluorescence. Le protocole est effectué selon les recommandations du fabricant (*In situ cell death detection fluorescein kit*, Roche). Cet essai TUNEL permet de détecter la fragmentation de l'ADN, lors de l'apoptose. Une enzyme détecte les brisures dans l'ADN et ajoute des bases d'UTP fluorescent aux fragments d'ADN génomique que l'on va retrouver en grand nombre lors de l'apoptose. Brièvement, les lames sont traitées à la protéinase K (Roche diagnostic), diluée 1/1000 dans le Tris-HCl 1mM pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, l'enzyme est mélangée au tampon d'incubation contenant les dUTPs fluorescents dans un ratio de 1 μ L d'enzyme pour 20 μ L de tampon. La solution d'enzyme est incubée pour une période de une heure à 37°C. Après cette incubation, les lames sont lavées dans le PBS 1X deux fois 5 minutes. Par la suite, la coloration au DAPI (Sigma-Aldrich) dilué 1 :10000 dans le PBS 1X, permettant de visualiser les noyaux, est effectuée en immergeant les lames dans cette solution pour une période de 5 minutes. Après ces contre-colorations, les lames sont rincées dans du PBS 1X, au moins 3 fois 5 minutes, avant d'être trempées rapidement dans l'eau pour enlever les traces de sels et être mises à sécher sous la hotte. Une fois séchées, les lames sont montées avec des lamelles et du milieu de montage pour immunofluorescence Vectashield Hard set (Vector laboratories) permettant de recouvrir les tissus et préserver la qualité des fluorophores. L'analyse des immunofluorescences et la prise d'images s'effectuent grâce à un microscope à fluorescence Leica DM LB2 (Leica MicroSystem) possédant des filtres spécifiques pour chacune des longueurs d'ondes utilisées avec les différents fluorophores.

2.21 Immunofluorescence sur les coupes en O.C.T.

Pour les immunofluorescences en O.C.T., les tissus ont été préalablement cryopréservés dans une solution d'O.C.T. Les coupes sont effectuées directement sur ces tissus dans un cryostat, comme décrites dans la section 2.13, avant d'être conservées à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation. Lors de l'immunofluorescence, les lames sont tempérées avant d'être immergées dans une solution d'éthanol 100% (Commercial Alcohols) pendant 10 minutes à -20°C, permettant la fixation du tissu. Les lames sont

ensuite rincées au PBS 1X avant d'être mise en contact avec la solution de blocage (PBT, voir section 2.12) afin de bloquer les site d'antigènes non-spécifiques pour une période de 30 minutes à la température ambiante. Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage (PBT) selon les conditions détaillées dans le tableau 7 et ils sont incubés pour un période de 14 à 18 heures à 4°C. À la suite de cette incubation, les lames sont rincées dans du PBS 1X pour deux périodes de cinq minutes. De façon similaire, les anticorps secondaires couplés à des fluorophores sont dilués dans la solution de blocage (PBT) précédemment utilisée (Tableau 7). Les tissus sont placés en incubation avec la solution d'anticorps secondaire pour une période de 1 heure 30 minutes à température ambiante, dans une chambre humide à l'abri de la lumière. Après cette étape, les lames sont rincées dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Ensuite, certaines contre-colorations peuvent être effectuées pour permettre une meilleure visualisation du tissu ou des noyaux cellulaires lors de la prise de photo. La contre-coloration au bleu d'Evan (Fisher Scientific), dilué 0.1% dans du PBS 1X, est effectuée en immergeant les lames dans cette solution pour 30 secondes. Après cette contre-coloration, les lames sont rincées dans du PBS 1X, au moins trois fois pour 5 minutes, avant d'être trempées rapidement dans l'eau pour enlever les traces de sels et être mises à sécher sous la hotte. Une fois séchées, les lames sont montées avec des lamelles et du milieu de montage pour immunofluorescence Vectashield Hard set (Vector laboratories) permettant de recouvrir les tissus et préserver la qualité des fluorophores. L'analyse des immunofluorescences et la prise d'images s'effectuent grâce à un microscope à fluorescence Leica DM LB2 (Leica MicroSystem) possédant des filtres spécifiques pour chacune des longueurs d'ondes utilisées avec les différents fluorophores.

Tableau 7. Conditions des anticorps utilisés en immunofluorescence-OCT

| | Antigènes reconnus | Dilutions | Sources animales | # anticorps, Compagnie |
|----------------------|-------------------------|-----------|------------------|--------------------------------|
| Anticorps primaire | Claudine-1 | 1:500 | Lapin | #51-9000, Invitrogen |
| | Claudine-2 | 1:500 | Lapin | #51-6100, Invitrogen |
| Anticorps secondaire | IgG Lapin (couplé FITC) | 1:300 | Aucune | # FI-1000, Vector laboratories |

2.22 Extraction de protéines

L'extraction de protéines s'effectue directement après le prélèvement des tissus, soit précisément du jéjunum, côlon proximal, moyen ou distal. Des morceaux d'environ 1cm de chacun de ces segments sont placés dans un tampon de RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5% TritonX-100, 0.2% SDS, 1% NP-40, 0.5% de désoxycholate de sodium) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases (10uL/mL de PIC, 10uL/5mL de sodium orthovanadate et 10μL/mL de PMSF (fluorure phenylméthanesulfonyle, Sigma-Aldrich). Pour permettre une désintégration du tissu et une extraction optimale des protéines, les tissus sont passés dans le TissueLyser LT (Qiagen, MD, USA) avec une bile d'acier inoxydable de 5 mm (Qiagen, MD, USA) avant de subir une sonication de faible intensité, à 15% pour 10 secondes, afin de briser les membranes cellulaires et détruire les fragments d'ADN et d'ARN. Les extraits sont laissés sur glace pour 10 minutes, permettant de réduire la chaleur et d'optimiser l'extraction protéique, et ils sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant, contenant les protéines extraites, est récolté et congelé rapidement dans l'azote liquide pour permettre leur conservation à long terme à -80°C.

2.23 Dosage protéique

La concentration protéique de chacun des extraits est déterminée grâce au dosage avec la trousse *Pierce BCA* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Les procédures sont effectuées selon les directives du fabricant. Brièvement 2μL des extraits sont placés en contact avec 200μL d'une solution colorimétrique pendant 15 minutes à 37°C. Par la suite, la concentration protéique est déterminée par la comparaison de l'absorbance des échantillons à 560nm de longueur d'onde avec ceux d'une courbe standard de concentrations connues de BSA (Sigma-Aldrich).

2.24 Immunobuvardage de type Western Blot

Les échantillons sont préparés afin d'obtenir une quantité précise de protéines, soit 15 à 20ug de protéines. Le volume correspondant à cette quantité de protéines par échantillon est mélangé avec 2μL d'une solution réductrice (DTT, NuPAGE sample reducing agent 10X,

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5µL du tampon de migration 4X (NuPAGE LDS buffer 4X, Invitrogen) pour un volume final de 20µl complété avec de l'eau. Pour permettre une dénaturation complète de la forme native des protéines, les échantillons sont incubés à 70°C pendant 10min. Les protéines sont ensuite placées sur un NuPAGE mini-gel contenant un gradient de concentration permettant de bien séparer les protéines selon leur taille, (gel 4-12% Bis-Tris, 10% Bis-Tris ou 3-8% sodium acétate, NuPAGE mini gels, Invitrogen). La migration s'effectue en condition dénaturante avec 200mL de tampon de migration (MOPS 20X ou TrisAcétate 20X, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) auquel on ajoute 500µl d'antioxydant (NuPAGE) pendant environ 1 heure à 200 Volts. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène de difluorure (PVDF, Roche diagnostic) à l'aide d'un trampon de transfert (Bicine, Tris, NuPAGE, Invitrogen) pendant 1 heure à 30 Volts. La qualité du transfert est vérifiée en colorant la membrane au rouge de ponceau 1X (Sigma-Aldrich). Suite à la décoloration de la membrane à l'eau et au méthanol, les sites non-spécifiques sont bloqués grâce à une incubation de 2 heures à température ambiante dans une solution de blocage contenant soit du lait en poudre (Carnation, Nestlé, ON, Canada) ou des protéines bovines BSA (Roche) dilués à 5% (p/v) dans du TBS1X/Tween20-0.1 % (v/v). Après la période de blocage, les anticorps primaires sont dilués dans cette même solution de blocage selon des conditions spécifiques à chacun des anticorps, retrouvées dans le tableau 8. L'incubation des membranes avec les anticorps primaires s'effectue pour une période de 14 à 18 heures avec agitation à 4°C. Après ce temps, les membranes sont lavées au TBS1X/Tween20-0.1 % avec agitation pour au moins 3 fois 5 minutes. Ensuite, elles sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort dilués dans la solution de blocage avec les conditions retrouvées dans le tableau 8. De façon similaire, les membranes sont lavées au TBS1X/Tween20-0.1 % avec agitation pour au moins 3 fois 5 minutes. La détection des bandes spécifiques s'effectue avec la solution *Pierce ECL2* (Thermo Scientific) permettant d'utiliser l'activité de la peroxydase et son substrat pour visualiser les bandes. Finalement, la membrane est exposée sur un film photographique Amersham Hyperfilm™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Tableau 8. Conditions des anticorps utilisés en Western Blot

| | Antigène reconnu | Dilutions | Sources animales | #anticorps, compagnie |
|------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|------------------------------|
| Anticorps primaires | β -Actine | 1/10 000 | Souris | #MAB1501R, Millipore |
| | E-cadhérine | 1 :1000 | Souris | #C20820, BD Transduction |
| | β -caténine | 1 :1000 | Lapin | #9587, Cell Signaling |
| | Claudine-1 | 1:500 | Lapin | #51-9000, Invitrogen |
| | Claudine-2 | 1:500 | Lapin | #51-6100, Invitrogen |
| | Cofiline | 1 :1000 | Lapin | #3318, Cell Signaling |
| | Phospho-Cofiline | 1 :1000 | Lapin | #3311, Cell Signaling |
| | MMP3 | 1 :300 | Souris | #IM70T, Oncogene |
| | Occludine | 1 :500 | Lapin | #71-1500, Invitrogen |
| | Phospho-Smad5 | 1 :1000 | Lapin | #ab76296, Abcam |
| | Syndécan-1 | 1 :500 | Lapin | #32-2900, Invitrogen |
| | α -Tubuline | 1 :1000 | Souris | #T9026, Sigma |
| Anticorps secondaires | IgG lapin (couplé à HRP) | 1 :3000 | Chèvre | #sc-2030, Santa Cruz |
| | IgG souris (couplé à HRP) | 1 :3000 | Singe | #sc-2096, Santa Cruz |

2.25 Extraction des ARN

Après le prélèvement des tissus, soit précisément du jéjunum, côlon proximal, moyen ou distal, des morceaux d'environ 1cm de chacun de ces segments sont placés directement dans l'azote liquide afin de les congeler rapidement pour conserver l'intégrité maximale des ARN. L'extraction des ARN s'effectue par la suite en commençant par une désintégration des tissus et une extraction optimale des ARN, à l'aide du *TissueLyser LT* et d'une bille d'acier inoxydable de 5 mm (Qiagen, MD, USA) et en présence de 500 μ l de la solution de dénaturation de la trousse *Totally RNA* (Ambion, CA, USA). Un volume équivalent de 500 μ l de la solution de phénol:chloroforme:IAA pH 6.6 est ajouté à chacun des échantillons. Les tubes sont agités vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex.

Le mélange est déposé sur glace pour 5 minutes. La solution complète est ensuite transférée dans des tubes *Phase Lock Gel* (5prime) et ensuite centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour permettre une meilleure séparation des différentes phases. La phase aqueuse générée par la centrifugation est recueillie et déposée dans un nouveau microtube, environ 500µL. Par la suite, on ajoute 1/10 du volume recueilli de la phase aqueuse (environ 50µL) de solution sodium d'acétate 5mM pH 5.5 (Ambion, CA, USA) qu'on mélange par inversion. Comme au départ, un volume équivalent de 500µl de la solution de phénol:chloroforme:acide pH 4.5 est ajouté à chacun des échantillons. Les tubes sont agités vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex. Le mélange est déposé sur glace pour 5 minutes. La solution complète est ensuite transférée dans des tubes *Phase Lock* (5prime, Gaithersburgs, MD, USA) pour permettre une meilleure séparation des différentes phases et les tubes *Phase Lock* sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse générée par la centrifugation est recueillie et déposée dans une nouvelle série de microtubes, pour un volume d'environ 500µL. Une étape de précipitation à l'isopropanol est effectuée par l'ajout d'un volume équivalent (500µL) d'isopropanol (Fisher Scientific), suivi d'un mélange par inversion et d'une incubation de 14 à 18 heures à -20°C. Cette incubation dans l'isopropanol est suivie d'une centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot restant est lavé avec 300µL d'éthanol 70 % tout en agitant doucement pour permettre d'enlever les sels résiduels. Une nouvelle centrifugation à 13 500 rpm pour 10 minutes à 4°C suit ce lavage, permettant de bien culoter les ARN. Le surnageant est jeté et le culot est bien asséché avant d'être resuspendu dans 50µL d'eau DEPC 0.1 % (Pyrocarbonate d'éthyle). Par la suite, les hydrates de carbones sont éliminés par une précipitation au chlorure de lithium (LiCl 10mM, Ambion, CA, USA). Pour ce faire, 25µL de LiCl est ajouté au 50µl d'ARN de l'étape précédente, suivi d'un mélange par inversion et d'une incubation de 30 minutes à -20°C. Après cette incubation, on effectue une centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot restant est bien asséché sous la hotte avant d'être resuspendu dans un petit volume de 30µL d'eau DEPC 0.1 %. La concentration (µg/µL) des ARN est vérifiée par le dosage de un µL de l'extrait d'ARN, à l'aide du doseur *Nanodrop* (ThermoScientific, DE, USA) et leur qualité est vérifiée par une migration sur un gel d'agarose 1 % dans un tampon MOPS dénaturant pendant 20 minutes à 100 volts.

2.26 DNase et transcription inverse

L'étape de DNase est nécessaire pour permettre d'enlever les traces d'ADN génomique présent dans les extraits d'ARN qui seront utilisés pour la réaction de transcription inverse. Pour ce faire, 10µl des extraits d'ARN sont utilisés auxquels on ajoute 1,2µl de tampon DNase 10x et 1U (0,2µl) de DNase I (Roche). Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, la DNase est inactivée grâce à l'ajout de 0,65µL de EDTA (100mM, Fisher Scientific) et d'une incubation à 75°C pendant 10 minutes.

La réaction de transcription inverse permet de transformer les ARNm présents en ADNc qui seront utilisés ultérieurement pour des analyses en PCR quantitatif (qPCR). Pour cette réaction, 2µg des ARN traités à la DNase sont ajustés à un volume final de 11,20µL avec de l'eau DEPC et sont dénaturés avec une incubation de 10 minutes à 75°C. suivi de 5 minutes sur glace. Par la suite, on ajoute à ce 10µl : 0,8µL de dNTPs 25mM (Invitrogen) 2,4µL d'oligos dT 0,5µg/µL (IDT Technology), 4µL de tampon de réaction transcriptase inverse AMV 5X (Roche), 0,5µL de transcriptase inverse AMV (Roche). Le mélange est incubé à 42°C pour une heure et ensuite à 95°C pour 5 minutes avant d'être refroidi sur glace. Le volume des échantillons est doublé avec l'ajout de 20µL d'eau stérile pour avoir une concentration finale de 0,2µg/µl. Par la suite, les ADNc sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses en qPCR où ils devront préalablement être dilués 1/10 dans de l'eau.

2.27 PCR quantitatif

Pour les expérimentations de PCR quantitatif (qPCR), les réactions d'amplification ont été réalisées avec la trousse FastStart essential DNA Green Master Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) en duplicata. Brièvement, 2µl des ADNc dilués 1:10 sont mélangés à 10µL d'eau, 6µL de *FastStart essential DNA Green Master Kit* et 1µL de chaque amorce (0.1µg/µL). Les réactions ont toutes été faites selon les recommandations du fabricant (Roche) en utilisant l'appareil *Light Cycler 96 System* (Roche). Les couples d'amorces

(IDT Technology) pour amplifier les gènes sélectionnés ont été désignés pour amplifier des fragments entre 100 et 200 pb (Tableau 9). Chaque expression d'un gène d'intérêt est comparée à celle d'un gène de référence soit *PBGD* (*porphobilinogen deaminase*) ou *TBP* (*Tata-box binding protein*).

Tableau 9. Amorces utilisées en qPCR

| Gène d'intérêt | Espèces | Séquence | T° | Taille du produit |
|-------------------------------|-------------------------------|---|----|-------------------|
| <i>Bmp2</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TAGATCTGTACCGCAGGCACT -3' 5'- AAGTTCCTCCACGGCTTCTT -3' | 59 | 132 pb |
| <i>Bmp4</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GAGGAGGAGGAAGAGCAGAGCC -3' 5'- GTTGAAGAGGAAACGAAAAGCAGAGC-3' | 59 | 115 pb |
| <i>Bmp7</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GCAGGACAGCCACTTCCTCACT -3' 5'- GTCACCGCTTCGCCCTCG -3' | 59 | 125 pb |
| <i>Ccl2</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA -3' 5'- GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT -3' | 59 | 120 pb |
| <i>Ccl8</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TCTACGCAGTGCTTCTTTGCC -3' 5'- AAGGGGGATCTTCAGCTTTAGTA -3' | 60 | 122 pb |
| <i>Ccl1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GAATCACCAACAACAGATGCAC -3' 5'- ATCCTGGACCCACTTCTTCTT -3' | 60 | 98 pb |
| <i>Chordin</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CATAGCCCTGCTCACCCCTCAGT -3' 5'- GCTCCCGAAGTAGCTGTCCCT -3' | 59 | 102 pb |
| <i>Cxcl1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GGAACCATTCTCACTGTGTGT -3' 5'- CCTACAACAGACCACACAAT -3' | 59 | 148 pb |
| <i>Cxcl12/</i> <i>Sdf1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TTCTTCGAGAGCCACATCGCCA -3' 5'- TTCGGGTCAATGCACACTTGTCT -3' | 59 | 207 pb |
| <i>Cxcr4</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TGCCCGGCATCGTCATCCTCT -3' 5'- CGTCTTGAGGGCCTTGCGCTT -3' | 59 | 104 pb |
| <i>Epim</i> | <i>Mus</i> | 5'- TGTGGAGAAGGATCATTTTCATGG -3' | 59 | 224 pb |

| Gène d'intérêt | Espèces | Séquence | T° | Taille du produit |
|---------------------------------|-------------------------------|--|----|-------------------|
| | <i>Musculus</i> | 5'- TGCTCAATAGACTTCAGCTTGC -3' | | |
| <i>Dkk3</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CGAGGGGAAATTGAGGAAAGCATCA -3' 5'- ATGATCGGAGGCAGACGGAGC -3' | 59 | 107 pb |
| <i>Fn1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- ATGTGGACCCCTCCTGATAGT -3' 5'- GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG -3' | 59 | 124 pb |
| <i>sFrp1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CGGTCATGCAGTTCTTCGGCT -3' 5'- GTTGTCGCATGGAGGACACACG -3' | 59 | 116 pb |
| <i>Fst</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TGCTGCTACTCTGCCAGTTC -3' 5'- GTGCTGCAACACTCTTCCTTG -3' | 60 | 130 pb |
| <i>Gremlin</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CTGGGGACCCTACTGCCAA -3' 5'- TTTGCACCAATCTCGCTTCAG -3' | 59 | 242 pb |
| <i>Hgf</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'-AGTCAAGAAAACGATGCTACTGGTATCC-3 5'- ACCGTCCCTTTATAGCTGCCTCC -3' | 59 | 79 pb |
| <i>Il1β</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TGCAGCTGTCTAATGGGAACG -3' 5'- AAGAGCTTCAGGCAGGCAGTA -3' | 59 | 126 pb |
| <i>Il6</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC -3' 5'- TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC -3' | 59 | 76 pb |
| <i>Noggin</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CCAGCACTATCTACACATCCG -3' 5'- CGTCTCGTTCAGATCCTTCTC -3' | 59 | 108 pb |
| <i>Pbgd</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CCTCCTGGCTTTACTATTGGA -3' 5'- TAGCTGAGCCACTCTCCTCAG -3' | 59 | 110 pb |
| <i>Pdgfa</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TGGCTCGAAGTCAGATCCACA -3' 5'- TTCTCGGGCACATGGTTAATG -3' | 59 | 85 pb |
| <i>PdgfR-β</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- TTCCAGGAGTGATAACCAGCTT -3' 5'- AGGGGGCGTGATGACTAGG -3' | 59 | 104 pb |
| <i>RSpond1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- AGGCAACCGATGGAGACGCA -3' 5'- CCATACTGACGCATTCTTCTCTTCG -3' | 59 | 122 pb |
| <i>Smad1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GAGTTCCCATTTGGTTCCAAG -3' 5'- GAGCCAGAAGGCTGTGCTGAG -3' | 59 | 136 pb |

| Gène d'intérêt | Espèces | Séquence | T° | Taille du produit |
|----------------|--|---|----------|-------------------|
| <i>Smad5</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- GATTTGCAGAGCCATCACGA -3' 5'- TTGTGGCTCAGGTTTCCTGAA-3' | 59 | 199 pb |
| <i>Smad8</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CCTCAAGGTCTTCAACAACCA -3' 5'- TTCACAAAGCTCATCCGAATC -3' | 59 59 | 117 pb |
| <i>Tbp</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> / <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- GGGGAGCTGTGATGGGAAGT -3' 5'- GGAGAACAATTCTGGGTTTGA -3' | 59 | 111 pb |
| <i>Tgfb1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- AGCAACAATTCCTGGCGTTA -3' 5'- ACGTCAAAAGACAGCCACTCA -3' | 59 | 145 pb |
| <i>Thbs1</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- CTGGGCATAGGGCCAAGAG -3' 5'- GCTTGACAATCCTGTTGAGATCA -3' | 59 | 201 pb |
| <i>Tnc</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- AGGTTACACAGGGATAGACTGCTCTG -3' 5'- CCATCAGCATGGGTGGGTGTG -3' | 59 | 136 pb |
| <i>Wnt5a</i> | <i>Mus</i> <i>Musculus</i> | 5'- AAGCAAACCAGCTCACCACA -3' 5'- CAGGCCTCGAAAACAACACA -3' | 59 | 104 pb |
| <i>BMP2</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- TAGACCTGTATCGCAGGCACHT -3' 5'- GTTTTCCCCTCGTTTCTGGT -3' | 59 | 154 pb |
| <i>BMP4</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- GGATCTTTACCGGCTTCAGCT -3' 5'- TGGGATGTTCTCCAGATGTTC -3' | 59 | 101 pb |
| <i>BMP7</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- TGTATGTCAGCTTCCGAGACC -3' 5'- GGCGTTCATGTAGGAGTTCAG -3' | 59 | 137 pb |
| <i>BMPR1a</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- AATGAAGTTGATGTGCCCTTG -3' 5'- GCAATTGGTATTCTTCCACGA -3' | 59 | 94 pb |
| <i>NOGGIN</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- GTAACCTCCTCCGCAGCTTCT -3' 5'- GCGAGATCAAAGGGATAGAGT -3' | 59 | 134 pb |
| <i>SMAD1</i> | <i>Homo</i> <i>Sapiens</i> | 5'- AGCAGGGGGTGCTAGTAACAT -3' 5'- CGGAACTGCAACTACCATCAT -3' | 59 | 122 pb |
| <i>SMAD5</i> | <i>Homo</i> | 5'- GGAGTTTGCTCAGCTTCTGG -3' | 59 | 143 pb |

| Gène d'intérêt | Espèces | Séquence | T° | Taille du produit |
|----------------|----------------|-------------------------------|----|-------------------|
| | <i>Sapiens</i> | 5'- ATCCTGCCGGTGATATTCTG -3' | | |
| <i>SMAD8</i> | <i>Homo</i> | 5'- CTGCCCCATGTGATTACTGT -3' | 59 | 165 pb |
| | <i>Sapiens</i> | 5'- CAAATGGGAACTCACAGCACT -3' | | |

2.28 Analyses statistiques

Les décomptes du nombre de cellules positives pour chacun des marquages ont été effectués à l'aveugle. Un minimum de 10 champs a été compté par souris. Afin d'avoir une population représentative, les comptes ont été effectués sur un minimum de 5 souris mutantes et 5 souris contrôles. Pour les décomptes cellulaires, puisqu'il s'agit de mesures répétées sur plusieurs individus différents subdivisés en deux groupes, le test statistique ANOVA à deux voies est utilisé. Pour les analyses des niveaux d'expression des ARN messagers ainsi que les analyses densitométriques des immunobuvardages, les valeurs de chaque échantillon ont été normalisées par rapport à la moyenne des souris contrôles. Par la suite, si les résultats suivent une distribution normale, le test T de Student est effectué. Pour les expériences dont les valeurs ne se conforment pas à la distribution normale le test de Mann-Whitney U a été effectué. Les résultats sont présentés avec la moyenne de chacun des groupes et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard moyenne (SEM, *standard error median*).

2.29 Culture cellulaire

La lignée cellulaire CCD-18Co a été achetée commercialement chez ATCC #CRL-1459 (ATCC American Type Culture collection, Manassas, VA, USA). Cette lignée est issue d'un clone de fibroblaste fétal colique humain. Les cellules 18Co sont cultivées dans du milieu EMEM #320-005-CL (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) contenant 10% de FBS (Wisent), 5mL de glutamax (Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (Life Technologies) et 5mL de pénicilline/streptomycine (Wisent). La pureté de la lignée cellulaire CCD-18Co a été vérifiée par le test *Cell Line Authentication Services* (ATCC American Type Culture collection).

Pour les productions virales, les cellules 293T #CRL-11268 (ATCC American Type Culture collection), issues de cellules de reins embryonnaires humaines, ont été cultivées dans

du milieu DMEM (Wisent), contenant 10% de FBS (Wisent), 5mL de glutamax (Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (Life Technologies) et 5mL de pénicilline/xsptomycine (Wisent).

2.30 Production et infection lentivirale

Les constructions pour shARN (shnon-ciblant et sh*Bmpr1a*) sont des constructions commerciales provenant de la compagnie Sigma. Les lentivirus ont été produits dans les cellules 293T par une transfection à la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) des constructions shARN et des différents plasmides exprimant les protéines d'encapsidation virale plp1, plp2 et plpvsbg. Après deux jours de productions virales, les milieux de culture contenant les virus ont été récoltés et filtrés à l'aide d'un filtre de 0,45µm (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Les cellules 18Co ont étéensemencées dans des pétris de 100mm. À 75% de confluence, elles ont été mises en contact avec 700 µl du milieu de culture contenant les virus et 2µg/mL de polybrène (Sigma-Aldrich) pendant 1 heure et ensuite 4mL de milieu de culture sont ajoutés. Les cellules sont ainsi incubées pendant trois jours à 37°C. Après les trois jours en présence de virus, les cellules sont lysées soit dans le tampon RIPA pour l'extraction protéique ou le tampon RLT (Qiagen) pour en extraire les ARN.

2.31 Traitement au LDN193189

Les cellules 18Co à 85% de confluence sont traitées au LDN193189 (Sigma-Aldrich) pour une période de 6 heures. Les traitements des cellules s'effectuent directement dans le milieu de culture cellulaire dans lequel le LDN193189 est dilué afin d'obtenir une concentration finale de 1µg/mL. Après les 6 heures de traitement, les cellules sont lysées soit dans le tampon RIPA pour l'extraction protéique ou le tampon RLT (Qiagen) pour en extraire les ARN.

2.32 Extraction de protéines des cellules en culture

Les cellules sont grattées et récoltées dans le PBS et un microtube de 1,5mL. Les cellules sont culotées à l'aide d'une centrifugation à 1000rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot est placé dans un volume d'environ 75µL de tampon de

RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5 % TritonX-100, 0.2 % SDS, 1 % NP-40, 0.5 % de désoxycholate de sodium) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases (10uL/mL de PIC, 10uL/5mL de sodium orthovanadate et 10uL/mL de PMSF (Sigma-Aldrich). Pour permettre une désintégration des membranes cellulaires et une extraction optimale des protéines, une sonication de faible intensité, 15% pour 10 secondes, est effectuée afin de briser les membranes cellulaires et détruire les fragments d'ADN et d'ARN. Les extraits sont laissés sur glace pour 10 minutes, permettant de réduire la chaleur et d'optimiser l'extraction protéique. Ils sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant contenant les protéines extraites est récolté et congelé rapidement dans l'azote liquide pour permettre leur conservation à long terme à -80°C.

2.33 Extraction d'ARN sur colonne

Les ARN des 18Co dans les 4 conditions (shnon-ciblant, sh*Bmpr1a*, DMSO, LDN193189), en triplicatas, ont été isolés à l'aide de la trousse *Qiagen RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

2.34 Micropuce à ADN

Les ARNS des 18Co dans les 4 conditions (shnon-ciblant, sh*Bmpr1a*, DMSO, LDN193189), en triplicatas, ont été isolés à l'aide de la trousse *Qiagen RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Les ARN ont été envoyés au Centre D'Innovation Génome Québec et Université de McGill où une micropuce de type *HumanHT-12 v4.0 Expression Bead Chip* (Illumina, San Diego, CA, USA) a été effectuée. Le programme FlexArray 1.6.1, crée par l'Université McGill, a été utilisé pour l'analyse statistique et la création de listes de données de gènes modulés. L'utilisation du logiciel *Ingenuity Analysis Pathway* (IPA de Qiagen) a permis de visualiser les voies de signalisation associées aux listes de gènes modulées

3. RÉSULTATS

3.1 Volet 1 : *Smad5* et la régulation de la barrière intestinale et de l'inflammation

3.1.1 Génotypage des souris *Smad5* ^{Δ CEI}

Les souris homozygotes *Smad5*^{loxP/loxP} ont été croisées avec la lignée de souris transgéniques *VillineCre* afin de générer les souris expérimentales (*Smad5* ^{Δ CEI}) et leurs contrôles (Figure 4A). Pour s'assurer du bon génotype des souris, l'ADN génomique extrait d'un orteil de souris est utilisé comme plateforme d'amplification pour PCR afin de déterminer la présence des allèles recherchés. Les amorces utilisées sont situées de part et d'autre des séquences loxP retrouvées sur le gène *Smad5*. L'insertion de cette séquence loxP augmente la longueur du brin amplifié de 105pb comparativement à l'allèle sauvage, permettant de visualiser sur gel d'agarose la présence de bandes correspondant spécifiquement aux deux types d'allèles (Figure 4B). Pour la Cre recombinase, les amorces utilisées reconnaissent la séquence génomique de cette Cre. Puisque la *VillineCre* est un transgène inséré aléatoirement dans le génome, un seul allèle doit être inséré dans le génome, mais permettant tout de même une expression suffisante de la Cre. Cela permet d'éviter la présence d'un phénotype associé à l'insertion aléatoire de deux allèles à la place d'un gène qui serait important chez la souris. De cette façon, la présence de la Cre est facilement détectable par l'apparition de la bande spécifique à la Cre (Figure 4C). Les souris *Smad5* ^{Δ CEI} sont viables et naissent selon un rapport mendélien. Elles sont confirmées en PCR par le fait qu'elles sont homozygotes pour les séquences loxP et qu'elles possèdent simultanément l'expression de la Cre comparativement aux souris contrôles qui seront homozygotes pour les séquences loxP mais ne posséderont pas la Cre (Figure 4).

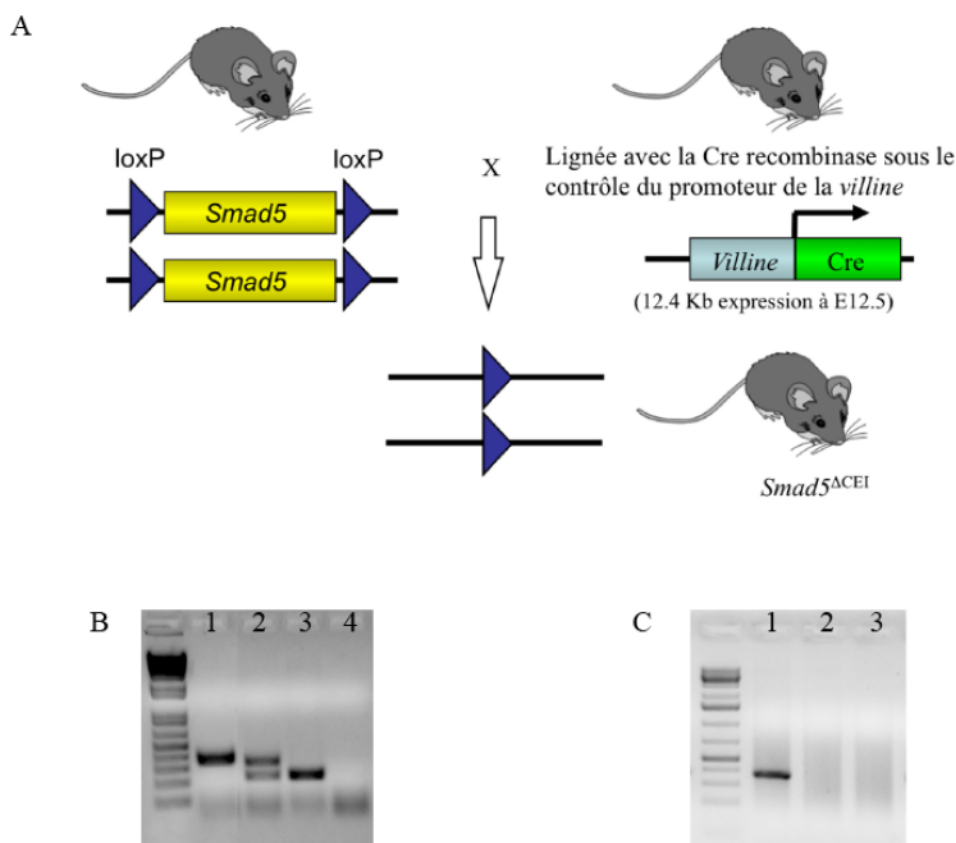


Figure 4. Détermination du génotype de la lignée de souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Représentation du système CreloxP utilisé pour la délétion conditionnelle de *Smad5* dans les cellules épithéliales intestinales (ΔCEI) (A). Migration sur gel d'agarose des amplicons de PCR pour le génotypage des lignées de souris *Smad5* (B) et *villineCre* (C). Pour le génotype *Smad5* (B), le puits 1 correspond au génotype homozygote pour les allèles loxP, le puits 2 est un hétérozygote (loxP/+), le puits 3 est une souris de type sauvage et le puits 4 est un contrôle négatif sans amplification. Pour le génotype de la *villineCre* (C), le puits 1 correspond à la présence de la Cre alors que le puits 2 est une souris de type sauvage, ne possédant pas le transgène et le puits 3 est un contrôle négatif sans amplification.

3.1.2 Validation de la perte d'expression de *Smad5*

Étant donné que chaque BR-Smad est présent dans les divers types cellulaires de la muqueuse intestinale (Arnold *et al.*, 2006), un enrichissement des cellules épithéliales a été effectué en utilisant la solution MatriSpense afin de confirmer la délétion du gène *Smad5* dans l'épithélium. Les allèles de délétion conditionnelle utilisées ne suppriment qu'une partie du gène *Smad5*. L'ARNm sera donc produit normalement, chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}, toutefois aucune protéine fonctionnelle ne sera produite permettant sa délétion spécifique.

Pour valider la délétion de *Smad5*, des amorces propres à la région excisée par la Cre sont utilisées, soit l'exon 2. Ainsi, elles permettront de confirmer sur l'ARNm la délétion d'une partie du gène *Smad5*. Des analyses comparatives de l'expression des ARNm de *Smad1*, 5 et 8 par qPCR ont été effectuées sur des enrichissements épithéliaux provenant des souris *Smad5*^{ΔCEI} et leurs contrôles (Figure 5). Ces analyses ont confirmé la perte d'expression à 97% de l'ARNm *Smad5* dans les cellules épithéliales intestinales. De plus, aucun changement compensatoire n'a été observé dans l'expression des autres effecteurs des Bmps, soit *Smad1* et *Smad8*.

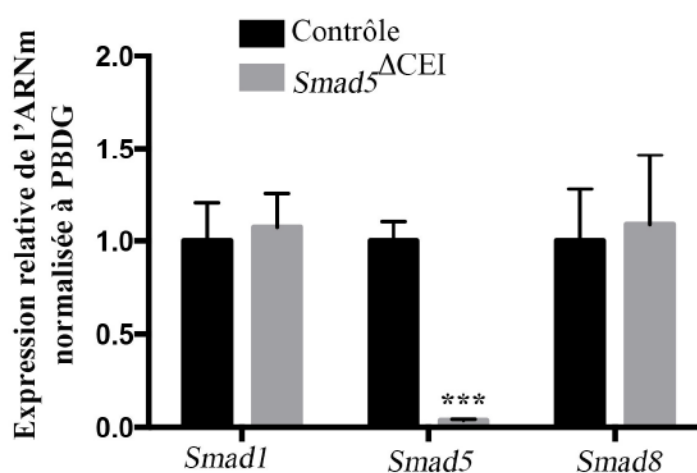


Figure 5. Validation de la perte d'expression de *Smad5* au niveau de l'épithélium intestinal.

L'ARNm des effecteurs des Bmps, *Smad1*, 5 et 8, a été analysé par qPCR et effectué sur des extraits d'enrichissement épithéliaux de jéjunum et de côlon de souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} âgées de 90 jours. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *** $p < 0.001$ selon le test T de Student, $n=5$ souris.

3.1.3 Effet de la perte de *Smad5* sur l'architecture de l'axe crypte-villosité

Pour déterminer si des changements morphologiques auraient lieu avec la perte de l'effecteur *Smad5*, des analyses histologiques ont été effectuées à l'aide de coloration H&E sur des lames d'intestin et de côlon de souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} âgées de 90 jours. Des souris âgées de 1 an ont aussi été analysées, mais elles comportaient le même phénotype que celles âgées de 3 mois. L'intestin et le côlon des souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent une architecture générale plutôt normale. Toutefois à plus fort grossissement, les villosités des

souris *Smad5*^{ΔCEI} sont allongées comparativement aux contrôles (Figure 6A). Contrairement, les glandes coliques ne présentent aucune modification dans leur morphologie (Figure 6B). Des mesures morphométriques ont été effectuées afin de confirmer l'allongement villositaire. Ces mesures démontrent une augmentation de 1.15 fois la longueur des villosités chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux contrôles (Figure 6C). Aucune modulation dans la longueur des cryptes intestinales ou des glandes coliques n'a été observée (Figure 6C).

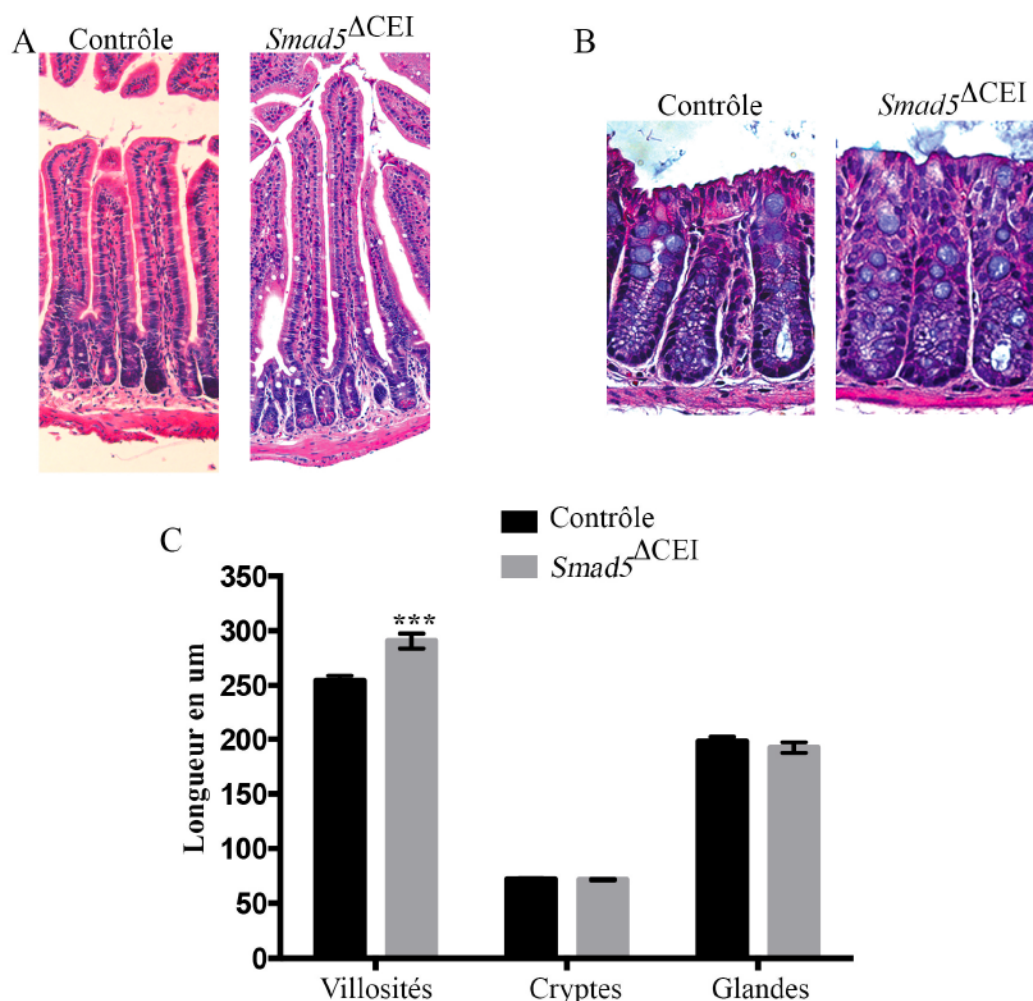


Figure 6. Impact de la délétion de *Smad5* sur l'architecture de l'axe crypte-villosité. Des colorations H&E ont été effectuées sur des coupes histologiques, en paraffine, de jéjunum (A) et de côlon (B) de souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} âgées de 90 jours. Les souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent un allongement des villosités et aucune modification des compartiments cryptaux ou de leurs glandes coliques comparativement aux souris contrôles (C). La longueur des villosités et cryptes intestinales ainsi que celle des glandes coliques a été déterminée avec le logiciel MetaMorph en mesurant 50 cryptes et villosités par animal (C). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, ***p < 0.001 selon le test ANOVA à 2 voies, n=6 souris.

3.1.4 Effet de la perte de *Smad5* sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules épithéliales

L'allongement villositaire suggère des possibles dérégulations dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et/ou l'apoptose des cellules épithéliales chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}. Des injections de BrdU, 90 minutes avant l'euthanasie, permettent de visualiser les cellules prolifératives retrouvées en nombre limité à la base des cryptes intestinales (Figure 7A) et coliques des souris contrôles (Figure 7B). Aucune modification significative dans le nombre de cellules prolifératives n'a été observée dans les deux tissus des souris *Smad5*^{ΔCEI}. Le décompte du nombre de cellules BrdU positives ainsi que les analyses statistiques confirment qu'aucune variation significative n'est observée dans les cellules prolifératives des deux tissus entre les souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} (Figure 7C).

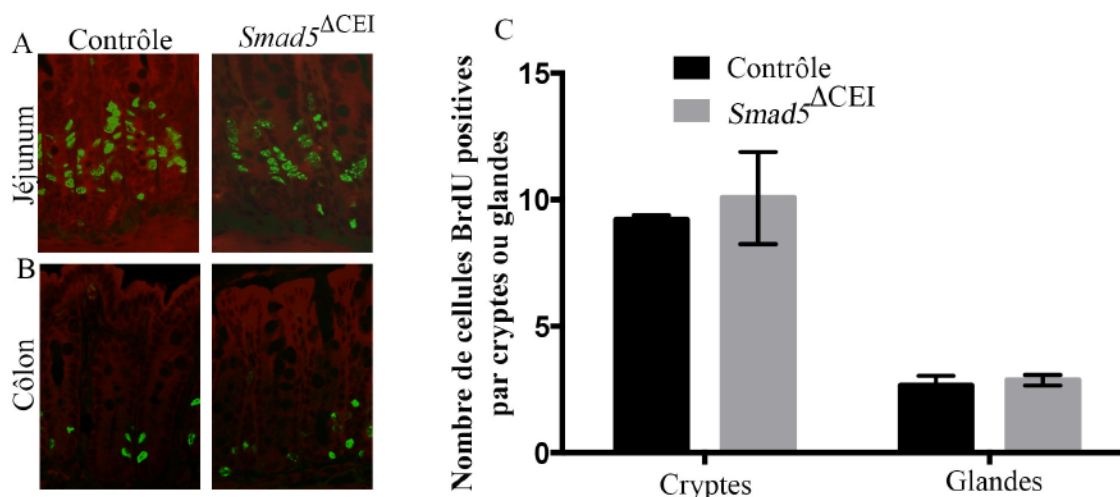


Figure 7. Analyse de la prolifération chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Les essais de prolifération sont effectués par l'injection péritonéale de BrdU 90 minutes précédant le sacrifice. Un anticorps fluorescent dirigé contre le BrdU permet de visualiser les cellules prolifératives, en vert, retrouvées à la base de la crypte (A) et des glandes coliques (B) chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} et contrôles. Le bleu d'Evans permet une contre-coloration du tissu en rouge. Le décompte du nombre de cellules BrdU positives des jéjunums et côlons ne révèle aucune modulation significative de prolifération chez les souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} (C). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, test ANOVA à 2 voies, n=6 souris.

Pour déterminer s'il y avait modification de la migration des cellules épithéliales des souris *Smad5*^{ΔCEI}, des injections de BrdU ont été réalisées, 48 heures avant l'euthanasie, pour visualiser la migration dans l'intestin grêle. De façon similaire, des injections de BrdU seulement 12 heures avant le sacrifice permettaient de visualiser la migration des cellules épithéliales du côlon spécifiquement. La migration des cellules ayant incorporé le BrdU est visualisée grâce à un anticorps fluorescent dirigé contre cet analogue de la Thymidine. Les essais de migration ont démontré une augmentation de la migration le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum des souris *Smad5*^{ΔCEI} (Figure 8A) comparativement aux souris contrôles. De façon opposée, les essais de migration de BrdU 12 heures avant le sacrifice pour le côlon n'ont démontré aucune modulation de la migration des cellules épithéliales des souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux contrôles (Figure 8B). Les mesures morphométriques de la distance de migration des cellules épithéliales ont confirmé l'augmentation significative de 22% de la migration dans le jéjunum et aucune modulation significative dans la migration du côlon des souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux contrôles (Figure 8C).

L'apoptose est évaluée grâce à l'essai TUNEL effectué par immunofluorescence, sur des coupes en paraffine de jéjunum et de côlon des souris âgées de 90 jours. L'essai TUNEL permet de révéler les cellules apoptotiques normalement retrouvées à l'apex des villosités, dans le jéjunum, et au niveau de l'épithélium de surface pour le côlon. Les cellules apoptotiques sont retrouvées de façon normale dans les cellules épithéliales du jéjunum (Figure 9A) et du côlon (Figure 9B) des souris contrôles. Les deux tissus des souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent aussi la présence des cellules apoptotiques aux mêmes localisations (Figure 9A-B) que les contrôles. De plus, les décomptes et les analyses statistiques ont permis de démontrer qu'il n'y avait pas de variation significative entre les souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux souris contrôles (Figure 9C).

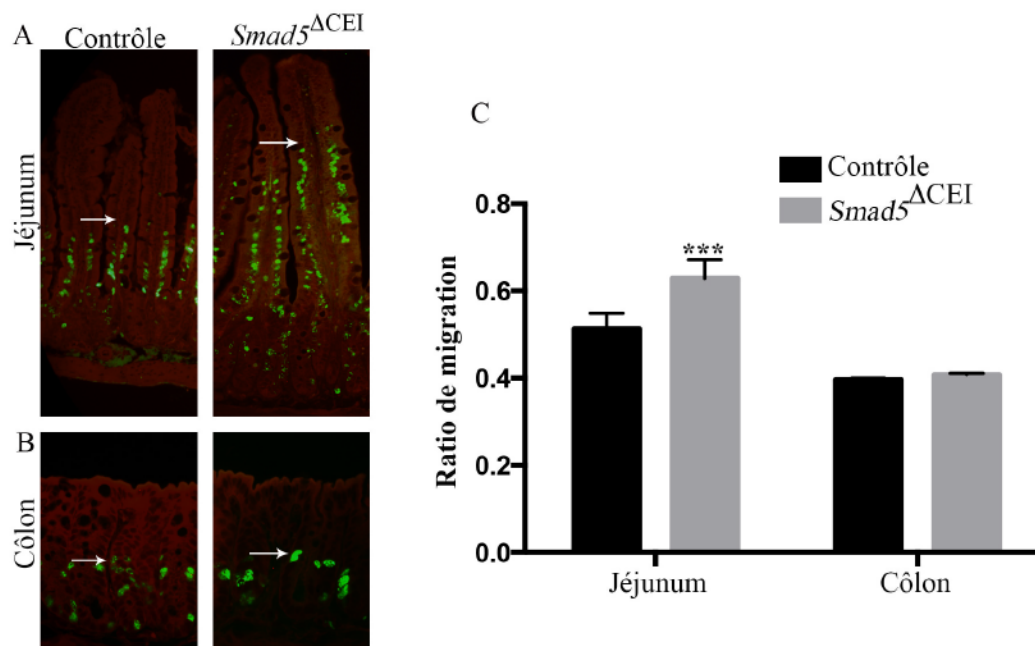


Figure 8. Analyse de la migration épithéliale chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Les tests de migration sont effectués par l'injection péritonéale de BrdU 48 heures (jéjunum) ou 12 heures (côlon) précédant le sacrifice. Une immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre le BrdU permet de visualiser les cellules en migration, en vert, retrouvées à la demi-villosité (A) et au milieu des glandes coliques (B) chez les souris contrôles. Chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} les cellules en migration se retrouvent dans les deux tiers supérieurs de la villosité (A) et au milieu des glandes coliques (B). Le bleu d'Evans permet une contrecoloration du tissu (rouge) et les flèches représentent la plus haute cellule BrdU positive. La mesure de la hauteur de la plus haute cellule BrdU positive, sur la longueur totale de l'axe crypte-villosité permet de déterminer le ratio de migration. Les mesures effectuées sur les jéjunums démontrent une augmentation significative dans la migration de cellules épithéliales des souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux souris contrôles. Les analyses statistiques des mesures du côlon ne révèlent aucune modulation significative de la migration entre les souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} (C). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *** $p < 0.001$ selon le test ANOVA à 2 voies, $n=6$ souris.

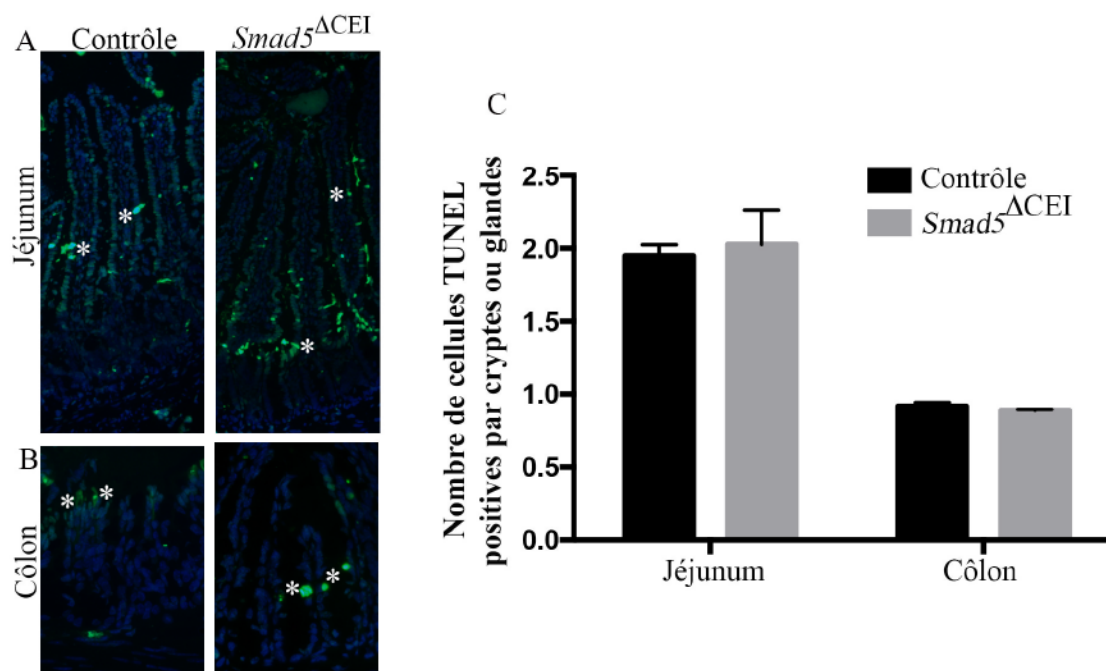


Figure 9. Analyse de l'apoptose chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}

L'apoptose est visualisée par un essai TUNEL qui marque les cellules apoptotiques, en vert, sur des sections de côlon et jéjunum des souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI}. Les cellules apoptotiques sont retrouvées à l'apex des villosités, dans le jéjunum (A), et à l'épithélium de surface du côlon (B), au niveau des souris contrôles. Aucune modulation n'est observée dans la localisation des cellules apoptotiques chez les deux tissus des souris *Smad5*^{ΔCEI} (A-B). Les astérisques représentent des cellules apoptotiques, TUNEL positives. Des analyses statistiques des décomptes des cellules TUNEL positives ne révèlent aucune différence significative du nombre de cellules apoptotiques entre les souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI} (C). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, test ANOVA à 2 voies, n=6.

3.1.5 Effet de la perte de *Smad5* sur la régulation du maintien du complexe apical de jonctions

Différents processus cellulaires pourraient expliquer ce qui se passe au niveau des cellules épithéliales des souris *Smad5*^{ΔCEI} pour leur permettre une plus grande migration. Il est connu qu'une constante réorganisation du complexe apical de jonctions est un processus nécessaire à la migration et le maintien de l'intégrité de l'épithélium digestif (Bruewer *et al.*, 2006; Turner, J R, 2000). Ce complexe de jonctions est retrouvé au niveau apical de la membrane latérale des cellules épithéliales. Il est composé des jonctions serrées, de jonctions adhérentes et des desmosomes. Afin d'analyser s'il pouvait y avoir des

modifications du complexe apical de jonctions au niveau des souris *Smad5*^{ΔCEI}, des analyses ultra-structurales de ces jonctions ont été effectuées par microscopie électronique. Ces analyses ont permis d'exposer des jonctions serrées plus relâchées et des plaques d'adhésion moins bien définies chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux contrôles, autant au niveau de leur jéjunum (Figure 10A) que du côlon (Figure 10B).

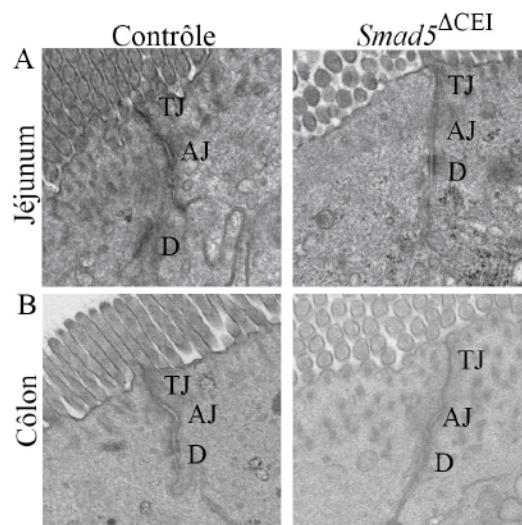


Figure 10. Impact sur l'apparence structurale du complexe apical de jonctions

Les analyses ultra-structurales par microscopie électronique permettent de visualiser l'apparence et la localisation des jonctions serrées, jonctions adhérentes et des desmosomes. Ces jonctions sont retrouvées à la membrane latérale, au niveau apical des cellules épithéliales du jéjunum (A) et du côlon (B) des souris contrôles. Les jonctions serrées apparaissent plus relâchées dans le jéjunum (A) et le côlon (B) des souris *Smad5*^{ΔCEI}. La plaque d'adhésion, au niveau des jonctions adhérentes, et les desmosomes sont moins définis dans les deux tissus des souris *Smad5*^{ΔCEI}. Grossissement 40 000X. TJ : Jonctions serrées, AJ : Jonctions adhérentes, D : Desmosomes.

Les analyses en microscopie électronique démontrant des différences significatives dans l'apparence visuelle des jonctions suggèrent de possibles problèmes dans la fonctionnalité du complexe apical de jonctions. De plus, il est démontré que des altérations dans l'expression ou la distribution des protéines composant les différentes jonctions peuvent grandement affecter leur fonctionnalité (Hartsock et Nelson, 2008; Prasad *et al.*, 2005). Des anticorps fluorescents dirigés contre des protéines des jonctions serrées ont été utilisées pour vérifier leur localisation spécifique. Les immunofluorescences permettant de visualiser la claudine-1 et claudine-2 ont permis de révéler leur localisation normale à la membrane latérale apicale des cellules épithéliales du jéjunum et du côlon des souris

contrôles (Figure 11A, B, C, D, respectivement). Ces analyses ont révélé une relocalisation plus cytoplasmique de la claudine-1 (Figure 11A-B) et suggèrent une légère augmentation des niveaux de la claudine-2 (Figure 11 C-D) dans les deux tissus des souris *Smad5*^{ΔCEI}.

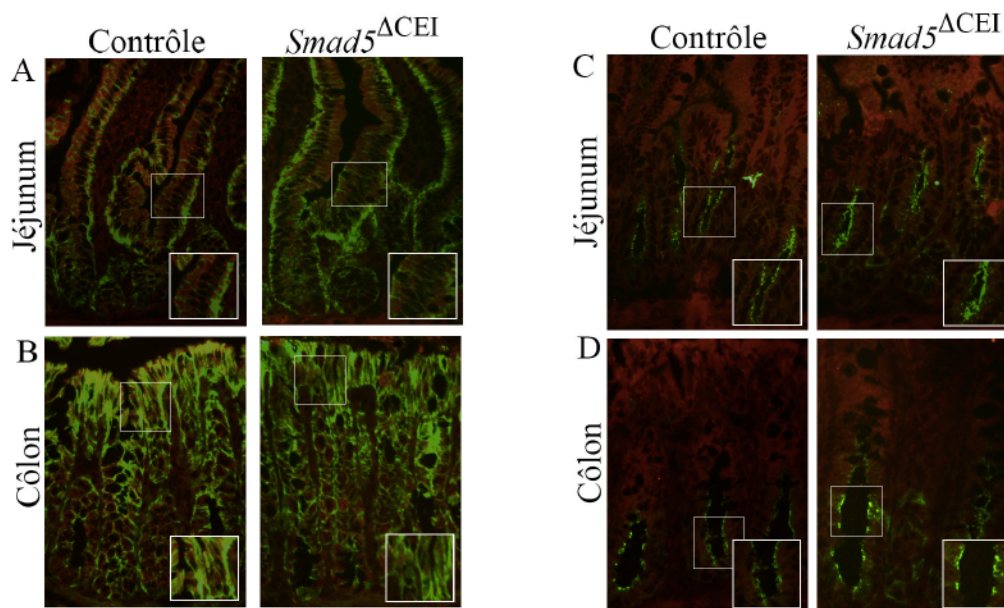


Figure 11. Localisation des protéines composant les jonctions serrées

Les immunofluorescences utilisant un anticorps spécifique contre la protéine claudine-1 démontrent une distribution diffuse de la claudine-1 dans le cytoplasme des souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement à la localisation apicale des souris contrôles, et ce autant dans le côlon que le jéjunum (A, B). L'anticorps fluorescent dirigé spécifiquement contre la claudine-2, démontre sa localisation à la membrane apicale des cellules épithéliales du fond des cryptes et des glandes coliques des souris contrôles (C, D). La claudine-2 se retrouve à être plus grandement exprimée et avec une localisation retrouvée plus haute dans les cryptes et glandes coliques souris *Smad5*^{ΔCEI} (C, D). Grossissement 400X (A-D) et les carrés blancs représentent des agrandissements des zones encadrées.

Les analyses ultra-structurelles démontrent aussi des plaques de jonctions adhérentes qui sont moins bien définies chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}, ce qui peut suggérer des modifications dans les niveaux de la protéine E-cadhérine ou une mauvaise localisation de cette protéine, une des principales composantes des jonctions adhérentes. Pour analyser la distribution de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales, des immunofluorescences dirigées spécifiquement contre la E-cadhérine ont été effectuées sur des jéjunums et des côlons de souris âgées de 90 jours. Une localisation cytoplasmique de la E-cadhérine est observée chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux souris contrôles (Figure 12 A-B). La β -caténine est une protéine qui est connue pour s'associer à la E-cadhérine au niveau des jonctions (Meng et Takeichi, 2009). La localisation de cette protéine a donc été analysée

par la technique d'immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé spécifiquement contre la β -caténine sur les jéjunums et côlons des souris de 90 jours. Une localisation plus cytoplasmique de la β -caténine est observée chez les souris $Smad5^{\Delta CEI}$ comparativement à la localisation à la membrane latérale chez les souris contrôles (Figure 12 C-D).

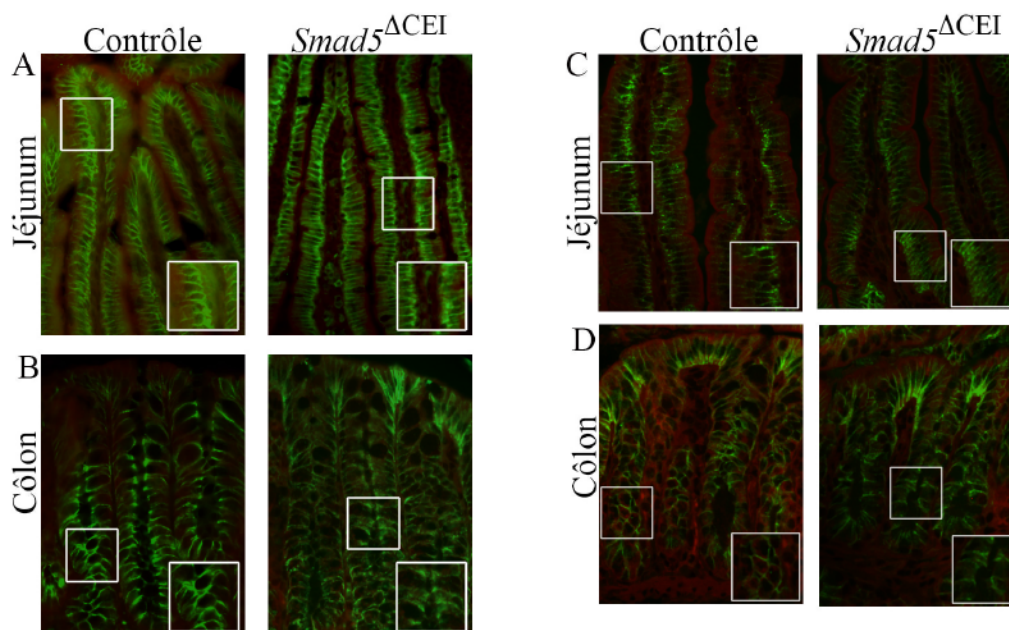


Figure 12. Localisation des protéines composant les jonctions adhérentes

Un anticorps fluorescent contre la protéine E-Cadhérine démontre une distribution diffuse de la E-Cadhérine dans le cytoplasme des souris $Smad5^{\Delta CEI}$ comparativement à une localisation à la membrane latérale des souris contrôles, et ce autant dans le côlon que le jéjunum (A, B). L'immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé spécifiquement contre la β -caténine, démontre sa localisation à la membrane latérale apicale de l'épithélium des souris contrôles (C, D). La β -caténine se retrouve à être plus localisée dans le cytoplasme dans les cellules épithéliales des cryptes et des glandes coliques des souris $Smad5^{\Delta CEI}$ (C, D). Grossissement 400X (A-D) et les carrés blancs représentent des agrandissements des zones encadrées.

Comme la modification de la localisation de ces protéines de jonctions ne veut pas nécessairement dire qu'il y a modification de leur niveau d'expression, il est important de vérifier quantitativement l'expression des protéines composant ces jonctions. Pour ce faire, des immunobuvardages ont été réalisés sur des extraits totaux de protéines de la muqueuse intestinale et colique. Les résultats, du jéjunum et du côlon, démontrent une réduction significative de la claudine-1 et une augmentation de la claudine-2 chez les souris $Smad5^{\Delta CEI}$ comparativement aux contrôles (Figure 13A, C). Pour les protéines composant les jonctions adhérentes, E-cadhérine et β -caténine, aucune modulation significative dans

leur expression n'a été remarquée entre les souris contrôles et les souris *Smad5*^{ΔCEI}. Les analyses par densitométrie permettent de démontrer les modulations statistiquement significatives ou non entre les souris contrôles et les souris *Smad5*^{ΔCEI} autant dans le jéjunum (Figure 13B) que dans le côlon (Figure 13D).

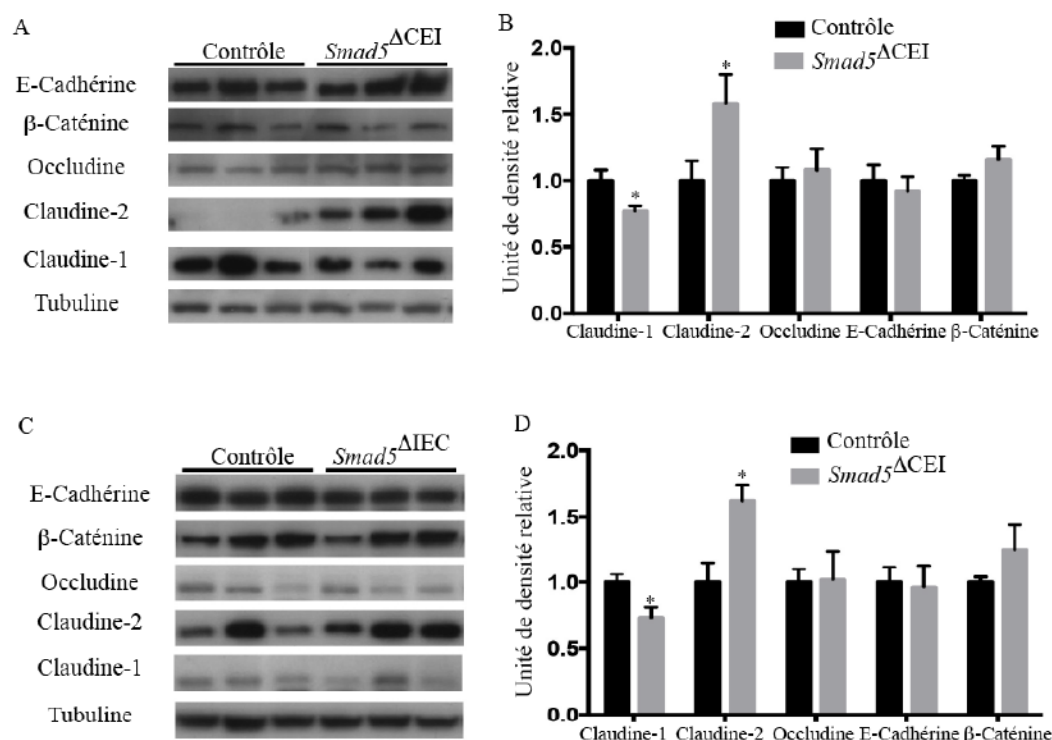


Figure 13. Expression des protéines composant le complexe apical de jonctions chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Les immunobuvardages ont été effectués sur les extraits totaux de jéjunum (A) ou de côlon (C) des souris contrôles ou *Smad5*^{ΔCEI} âgées de 90 jours. L'expression protéique de la claudine-1, claudine-2, l'occludine, la E-cadhérine, la β-caténine et la tubuline a été déterminée par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chacune des protéines. L'expression relative de ces protéines a été déterminée par densitométrie, en utilisant le logiciel ImageJ (B, D). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, **p* < 0.05, selon le test T de Student, *n*=6 souris.

3.1.6 Effet de la perte de *Smad5* sur des protéines de la réorganisation du cytosquelette

Différents processus cellulaires pourraient expliquer ce qui se passe au niveau de cellules épithéliales des souris *Smad5*^{ΔCEI} pour leur permettre une plus grande migration. Il est connu qu'une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine est un processus

important dans le désassemblage du complexe apical de jonctions et dans la migration cellulaire (Ivanov *et al.*, 2004). Le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF-1), maintenant appelé la cofiline, est une protéine qui se lie à l'actine et permet la dépolymérisation de ses filaments. Lorsque la cofiline est phosphorylée, elle est maintenue dans un état inactif donc incapable de se lier à l'actine. Toutefois, sa déphosphorylation réactive sa capacité à lier l'actine ainsi que son activité de dépolymérisation de l'actine (Agnew *et al.*, 1995). La déphosphorylation de la cofiline a été démontrée pour diriger la migration cellulaire directionnelle des cellules épithéliales (Ghosh *et al.*, 2004). De plus, sa déphosphorylation et l'activation subséquente de son activité de dépolymérisation de l'actine ont été démontrées pour engendrer la perturbation des contacts intracellulaires, résultant à une internalisation rapide de la E-cadhérine dans le compartiment cytosolique (IvanovHunt, *et al.*, 2005). Puisque les souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent une internalisation de la E-cadhérine ainsi qu'une augmentation de leur vitesse de migration, l'état de phosphorylation de la cofiline a été analysé dans ces souris. Des analyses par immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques de muqueuse jéjunale ont été effectuées afin de déterminer les niveaux de phosphorylation de la cofiline. Une diminution de son état phosphorylé est observée chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} comparativement aux souris contrôles (Figure 14). Ce résultat suggère que la cofiline, étant plus déphosphorylée, va favoriser la dépolymérisation de l'actine. Comme précédemment mentionné, ceci peut causer la déstabilisation des contacts intracellulaires avec la E-cadhérine suivi de son internalisation, évènement que l'on retrouve chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} et qui affecte grandement la migration des cellules épithéliales.

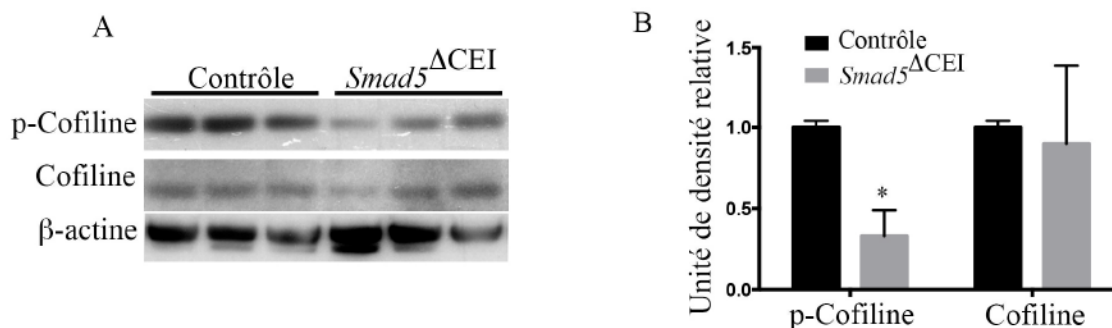


Figure 14. Expression de l'état de phosphorylation de la Cofiline dans les souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Les immunobuvardages ont été effectués sur les extraits totaux de jéjunum (A) ou de côlon (C) des souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI}, âgées de 90 jours. L'expression protéique totale de la β -actine et de la cofiline, ainsi que l'état de phosphorylation de la cofiline ont été déterminées par l'utilisation d'anticorps spécifique contre chacune de ces protéines. L'expression relative des protéines a été déterminée par analyse densitométrique, en utilisant le logiciel ImageJ (B, D). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, * $p < 0,05$ selon le test T de Student, $n = 3$ souris.

3.1.7 Implication des éléments de la signalisation des Bmps dans les maladies inflammatoires

La barrière intestinale est une composante qui est régulièrement modifiée chez les patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales puisque que la perte de son intégrité mène souvent à une augmentation de la perméabilité intercellulaire (Xavier et Podolsky, 2007). Le complexe apical de jonctions, pour sa part, est souvent l'une des principales structures permettant de réguler l'intégrité de cette barrière (Ivanov, Nusrat, *et al.*, 2005). Ce complexe étant modulé dans les souris *Smad5*^{ΔCEI}, il serait possible que la signalisation des Bmps puisse être protectrice face aux maladies inflammatoires intestinales. Tout d'abord, il est primordial de vérifier, si dans ces maladies, on peut retrouver des modulations d'expression des protéines clés de la voie de signalisation des Bmps. Ceci permettra de déterminer si des modulations dans cette signalisation peuvent réellement être associées à une susceptibilité aux maladies inflammatoires intestinales. Une analyse d'expression des gènes, par qPCR, a été effectuée sur des ADNc provenant de biopsies de patients atteints soit de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse, comparativement à des personnes saines. Le ligand BMP2, le récepteur BMPRI1A, les différents effecteurs SMAD1, SMAD5 et SMAD8, ainsi que l'antagoniste NOGGIN sont tous des gènes qui ont été analysés sur les

mêmes ADNc de patients. Les niveaux du transcrit de *Smad5* se sont avérés à être significativement diminués de 44% chez les patients atteints de Maladie de Crohn et de plus de 67% chez les patients atteints de colite ulcéreuse (Figure 15). De façon similaire, le ligand *BMP2* est aussi grandement diminué dans les deux types de maladies, soit de 52% pour la maladie de Crohn et de 77% pour la colite ulcéreuse, et l'antagoniste *Noggin* se retrouve diminué de 73% dans la colite ulcéreuse. De façon intéressante, les autres effecteurs de la signalisation des Bmps, SMAD1 et SMAD8, se comportent de façon différente que celle de SMAD5. Effectivement, l'ARNm de SMAD1 s'est retrouvé grandement augmenté de plus de 5 fois dans les deux maladies et l'ARNm de SMAD8 est augmenté de 3 fois dans la maladie de Crohn seulement. Pour sa part, le récepteur *BMPRI1A* n'est pas modulé de façon significative dans les maladies inflammatoires intestinales.

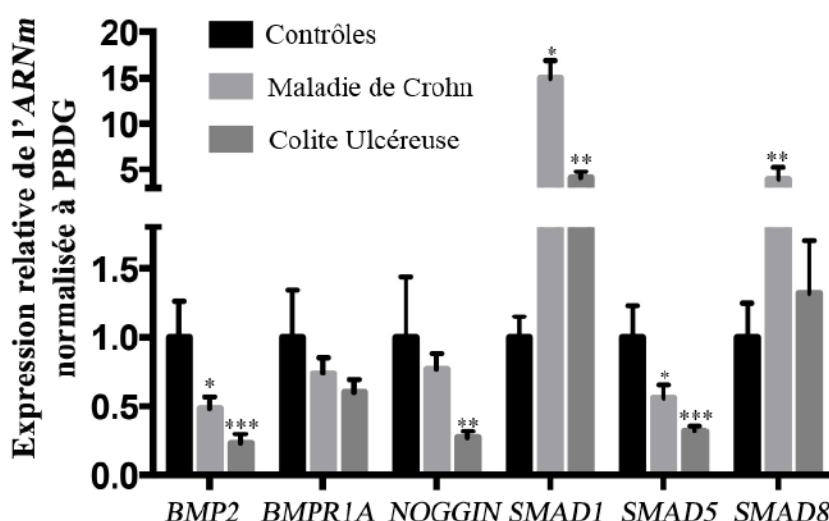


Figure 15. Expression des composants de la signalisation des Bmps chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.

Les ARNm du ligand *BMP2*, du récepteur *BMPRI1A*, de l'antagoniste *NOGGIN* et des effecteurs *SMAD1*, 5 et 8, ont été analysés par qPCR. Ces analyses ont été effectuées sur des extraits d'ADNc provenant de biopsies de 21 patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse respectivement. Une série de 6 échantillons de côlons provenant de personnes non-atteintes est utilisée comme contrôle. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ selon le test T de Student, $n=6$ contrôles, $n=21$ Maladie de Crohn et $n=21$ Colite Ulcéreuse.

Les études dans le laboratoire de la professeure Perreault sont effectuées sur des modèles murins. De ce fait, il est nécessaire de confirmer si les modulations obtenues chez

les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, sont aussi présentes chez les souris. Un modèle expérimental de colite chimique, induite au DSS, a permis de recréer des ulcérations importantes dans la muqueuse colique murine se comparant grandement à la colite ulcéreuse (Okayasu *et al.*, 1990). Cette colite chimique a été induite chez des souris de type sauvage pour permettre l'analyse, par qPCR, de l'expression des gènes de la signalisation des Bmps, précédemment analysés chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. Ces analyses démontrent que les ligands des Bmps (Bmp2, Bmp4 et Bmp7) sont modulés à la baisse, tout comme les différents effecteurs (Smad1, Smad5 et Smad8) et le récepteur *Bmpr1a* de la voie de signalisation des Bmps qui se retrouvent grandement diminués après deux, quatre et sept jours de colites chimiques (Figure 16). L'expression du gène antagoniste des Bmps Noggin, pour sa part, est augmentée de plus de 2 fois à deux, quatre et sept jours de la colite chimique corrélant avec une inhibition de la voie de signalisation durant les jours de colite.

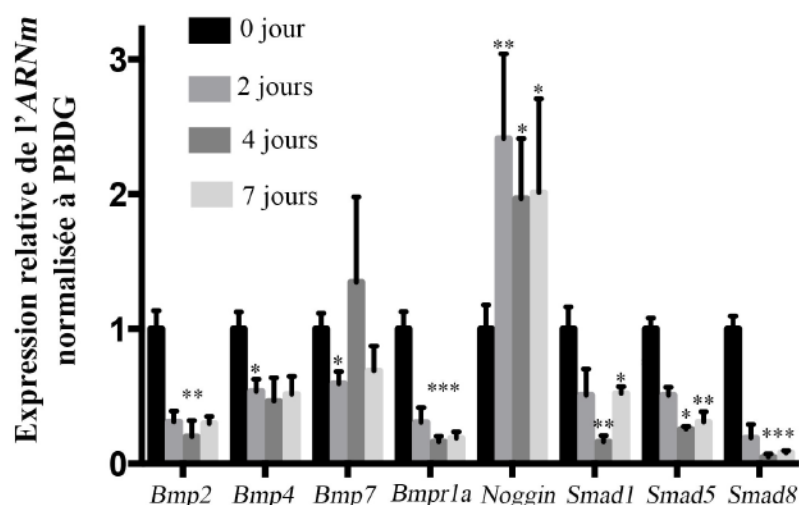


Figure 16. Expression des composants de la signalisation des Bmps dans un modèle murin de colite chimique.

Les ARNm des ligands (Bmp2, Bmp4, Bmp7), du récepteur *Bmpr1a*, de l'antagoniste Noggin et des effecteurs (Smad1, 5 et 8), ont été analysés par PCR quantitatif (qPCR) sur des extraits d'ADNc provenant de côlons inflammés de souris ayant été traitées au DSS pendant 2, 4 ou 7 jours. Une série d'ADNc de côlons provenant de souris non-traitées est utilisée comme contrôle. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ selon le test T de Student, $n=4$ souris.

Afin de valider les modulations des ARN messagers, les niveaux protéiques de certaines protéines ont été évalués. Malheureusement, le manque d'anticorps spécifiques fonctionnels pour les éléments de la voie de signalisation des Bmps ne permet pas de valider les modulations observées pour toutes les cibles analysées pour l'ARNm. L'état de phosphorylation de Smad5 a été évalué par immunobuvardage sur la même cohorte de souris utilisée pour la figure 16, mais en utilisant un anticorps spécifique ciblant uniquement deux phosphorylations de la protéine Smad5. On observe que dès les premiers jours de colite, la phosphorylation de Smad5 diminue par rapport aux souris non traitées (0 jours) (Figure 17). De plus, la phosphorylation de l'effecteur Smad5 tend à revenir à la normale vers le septième jour de colite. Dû au manque d'anticorps spécifiques, les niveaux totaux de la protéine Smad5 n'ont pas pu être analysés. Ce résultat démontre seulement des modulations de l'état d'activation de Smad5 associé à ces niveaux de phosphorylation.

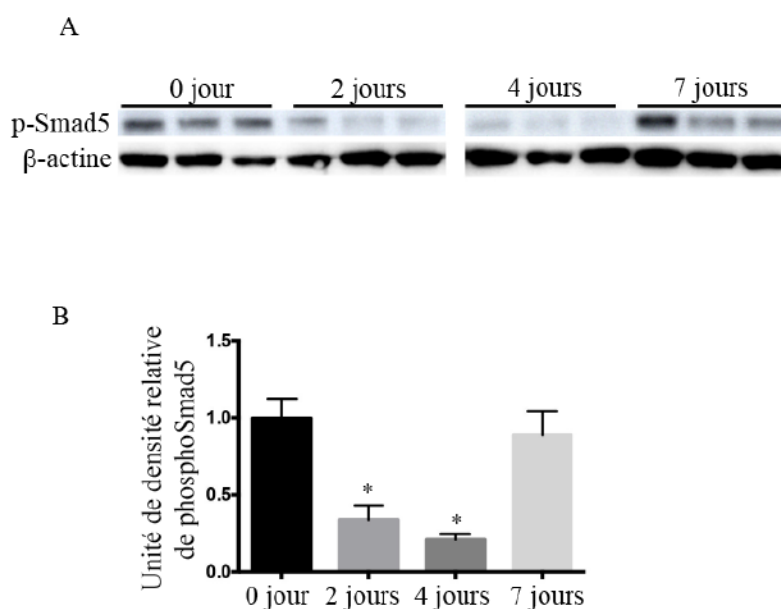


Figure 17. Expression de l'état de phosphorylation de Smad5 pendant une colite chimique.

Les immunobuvardages ont été effectués sur les extraits totaux de jéjunum (A) des souris CD1, âgées de 90 jours et soumises à un traitement DSS 3% pour une période de 0, 2, 4 et 7 jours. L'expression protéique totale de la β -actine et la phosphorylation de Smad5 ont été déterminées par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chacune de ces protéines. L'expression relative des protéines a été déterminée par analyse densitométrique, en utilisant le logiciel ImageJ (B). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, * $p < 0,05$ selon le test T de Student, $n = 3$ souris.

3.1.8 Effet de la perte de *Smad5* sur la susceptibilité à la colite chimique

Les résultats obtenus démontrent que la signalisation des Bmps est grandement modulée à la baisse autant chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, que dans le modèle murin de colite chimique dans les premiers jours d'inflammation. De plus, cette signalisation semble vouloir revenir à l'état basal dans la phase la plus aigue de la maladie, puisqu'on observe la ré-expression de *Smad5* phosphorylé au 7^{ième} jour de la colite chimique. Les souris *Smad5*^{ΔCEI}, âgées de 90 jours, ont reçu 3 % de DSS dans l'eau de boisson pendant sept jours afin de déterminer leur susceptibilité à la colite chimique. Afin de déterminer l'évolution de la colite, l'index d'activité de la maladie (DAI) est compilé en calculant la moyenne des scores obtenus pour les signes cliniques évalués quotidiennement. Chacun des critères est noté de 0 à 4 (note minimale à note maximale, respectivement) : perte de poids, consistance des selles, présence de sang dans les selles et saignement rectal. La comparaison des signes cliniques de la colite entre les souris contrôles et expérimentales révèle un index d'activité de la maladie plus sévère chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} associé avec la détérioration de l'état général des souris (Figure 18). En effet, les souris contrôles démontrent un DAI de 0.71 (4 jours) et 5.75 (7 jours) comparativement à un DAI de 1.79 (4 jours) et 9.67 (7 jours) chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}. Ce résultat nous suggère que les souris expérimentales sont plus susceptibles à la colite ulcéreuse que les souris contrôles.

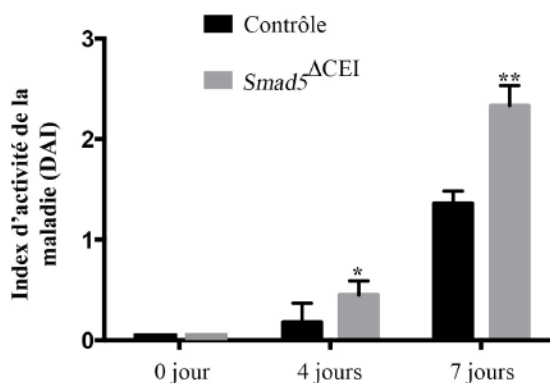


Figure 18. Susceptibilité à la colite chimique des souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI}.

Une colite chimique a été induite par l'ajout de DSS 3 % dans l'eau de boisson des souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI}, pour une période de 4 ou 7 jours. Les signes cliniques de colite ont été évalués lors du sacrifice des souris selon un score de 0 à 4 (du minimum au maximum), compilés et leur moyenne nous donne l'index d'activité de la maladie (DAI). Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, **p*<0,05 ***p*<0,01 selon le test T de Student, *n*=8 souris.

Ces résultats de signes cliniques ont été corrélés avec l'évaluation des signes histologiques de la maladie retrouvée au niveau des côlons. Ces signes histologiques sont évalués sur les coupes en paraffine de côlons, colorés à l'H&E (Figure 19A). La sévérité de l'inflammation, l'étendue de l'inflammation, le degré de dommages aux cryptes ainsi que le pourcentage d'atteinte représentent les quatre critères évalués selon un score de 0 à 4 (note minimale à note maximale, respectivement). Corrélant avec le DAI, on observe que les souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent un état général d'inflammation plus sévère, des dommages à l'épithélium plus sévères et sur des régions plus étendues. En effet, les souris expérimentales démontrent un score histologique de 6.35, ce qui est 40 % plus élevé que celui des souris contrôles de 4.48, après 7 jours (Figure 19B). Ce résultat est aussi observable sur les micrographies représentatives des H&E des côlons distaux des souris contrôles et expérimentales retrouvées en figure 19A.

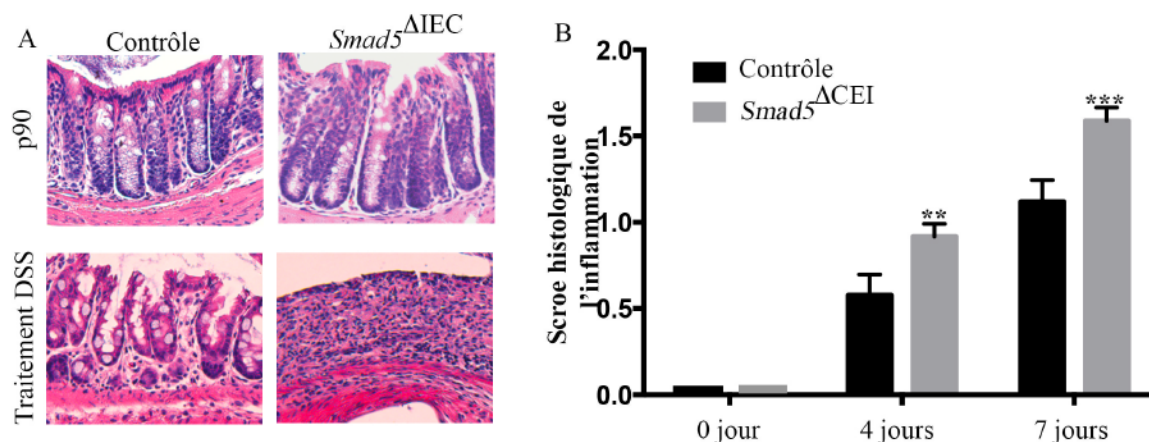


Figure 19. La perte épithéliale de Smad5 augmente les signes histologiques à la colite chimique.

Une colite chimique a été induite par l'ajout de DSS 3 % dans l'eau de boisson des souris contrôles et *Smad5*^{ΔCEI}, pour une période de 4 ou 7 jours. Images représentatives d'une portion du côlon distal colorée à l'H&E, soit non-traitée ou traitée au DSS (A). Les signes histologiques d'inflammation ont été évalués sur les côlons distaux colorés à l'H&E, selon un score de 0 à 4 (du minimum au maximum), additionnés et leur moyenne représente le score histologique total (B). Grossissement 200X (A). Le graphique (B) représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p<0,05 **p<0,01 selon le test T de Student, n=8 souris.

Puisque la protéine Smad5 est ré-exprimée tardivement après l'apparition de la colite, il est intéressant de regarder si les souris déficientes en *Smad5* pourraient avoir des problèmes dans la phase de réparation subséquente à la colite. Un traitement DSS de

récupération est donc effectué pour vérifier cette hypothèse. L'induction de colite chimique par le DSS 3 % pour 7 jours est suivie d'une période de récupération prévue de 14 jours, pendant laquelle les souris boivent de l'eau normale pour permettre la réparation des ulcérations intestinales. De façon dramatique, le traitement de récupération a mené à la mort de 33% des individus *Smad5*^{ΔCEI} durant les cinq premiers jours de récupération, moment où le traitement fut arrêté afin d'éviter de perdre toute la cohorte de souris expérimentales. Il est à noter qu'aucune mort n'est survenue dans la cohorte de souris contrôles ayant subi le même traitement. Le graphique de suivi de leur perte de poids permet d'illustrer le décès (croix †) précipité des souris *Smad5*^{ΔCEI} ainsi que leur incapacité à reprendre du poids pendant la période de récupération, comparativement aux souris contrôles (Figure 20A). De plus, les souris *Smad5*^{ΔCEI} présentent un index de gravité de la maladie (DAI) (Figure 20B) supérieur à celui des souris contrôles qui est corrélé avec le score histologique (Figure 20C) et les dommages à la muqueuse retrouvés chez ces souris (Figure 20D). Ayant été incapable de poursuivre le traitement de récupération, en plus de n'avoir aucune évidence de régénération de la muqueuse intestinale, ceci démontre que les souris *Smad5*^{ΔCEI} présentent une plus grande susceptibilité aux stimulus inflammatoires ainsi qu'un défaut de réparation de leur barrière intestinale.

En résumé, le modèle murin possédant la délétion spécifique de *Smad5* dans les cellules épithéliales seulement a permis de démontrer des rôles spécifiques à cet effecteur de la signalisation des Bmps. Les expériences effectuées sur ce modèle ont établis que *Smad5*, en régulant de façon indirecte l'état de phosphorylation de la cofiline, était responsable de l'intégrité du complexe apical de jonctions des cellules épithéliales. Ce phénomène leur confère un pouvoir migratoire supérieur, mais rend leur étanchéité et la fonction de barrière plus instable. C'est pourquoi, malgré que les souris *Smad5*^{ΔCEI} auraient le potentiel d'avoir une réparation de blessure plus rapide, elles font face à une plus grande susceptibilité à la colite chimique ainsi qu'un grand défaut de réparation de la muqueuse intestinale à la suite d'une blessure intestinale.

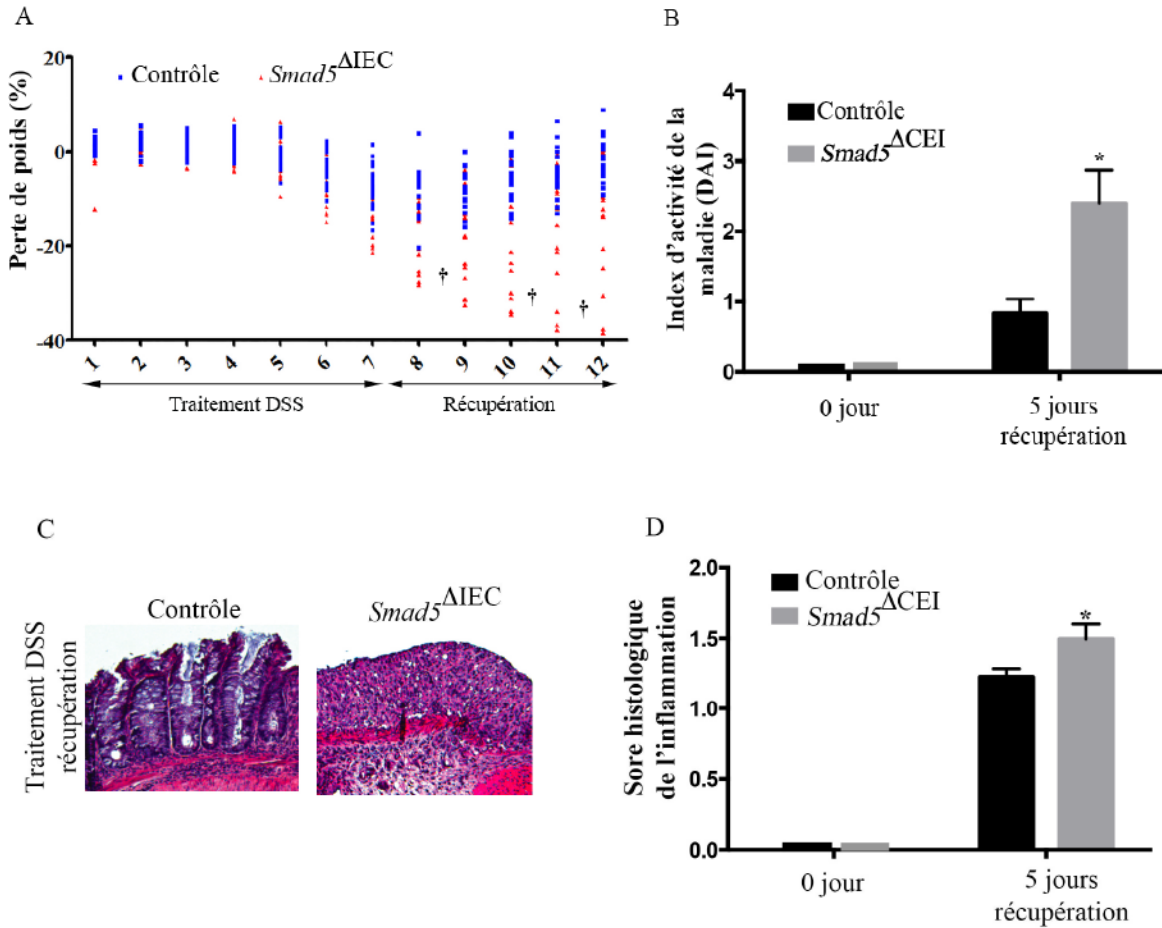


Figure 20. La perte épithéliale de Smad5 entraîne des défauts de réparation à la suite de la colite chimique.

Une colite chimique a été induite par l'ajout de DSS 3 % dans l'eau de boisson des souris contrôles et $Smad5^{\Delta IEI}$, pour une période de 7 jours, après laquelle a suivi une période de récupération avec de l'eau normale pour 5 jours. La perte de poids quotidienne, en pourcentage, est représentée sur le graphique où la mort des individus est représentée par des croix (†) (A). Les signes cliniques de colite ont été évalués lors du sacrifice des souris selon un score de 0 à 4 (du minimum au maximum), compilés et leur moyenne représente l'index d'activité de la maladie (DAI) (B). Images représentatives d'une portion du côlon distal colorée à l'H&E, soit non-traitée ou traitée au DSS (C). Les signes histologiques d'inflammation ont été évalués sur les côlons distaux colorés à l'H&E, selon un score de 0 à 4 (du minimum au maximum), additionnés et leur moyenne représente le score histologique total (D). Grossissement 200X (C). Les graphiques (B, D) représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, * $p < 0,05$ selon le test T de Student, $n = 10$ souris.

3.2 Volet 2 : La signalisation mésenchymateuse des *Bmps* et la régulation du microenvironnement et de la polypose

3.2.1 Génotypage des souris *Bmpr1a*^{ΔMes}

Pour générer les souris expérimentales (*Bmpr1a*^{ΔMES}) et leurs contrôles, les souris *Bmpr1a*^{loxP/loxP} ont été croisées avec la lignée de souris transgéniques *FoxL1Cre* (Figure 21A). Le bon génotype de chacune des souris est assuré par un PCR effectué sur l'ADN génomique extrait d'un orteil de souris afin de déterminer la présence des allèles recherchés. De façon similaire au projet 1, les amorces spécifiques aux séquences loxP retrouvées sur le gène *Bmpr1a*, permettant de visualiser sur gel d'agarose la présence des types d'allèles recherchés, de type sauvage ou loxP (Figure 21B). La Cre est aussi détectée par la présence ou non de la bande spécifique aux mêmes amorces pour la Cre utilisées dans le projet *Smad5* (Figure 4C). Les souris *Bmpr1a*^{ΔMes} sont viables et naissent selon le rapport mendélien attendu soit 25%. Elles sont confirmées en PCR par le fait qu'elles sont homozygotes pour les séquences loxP et qu'elles possèdent simultanément l'expression de la Cre comparativement aux souris contrôles qui seront homozygotes ou hétérozygotes pour les séquences loxP mais ne posséderont pas la Cre (Figure 21).

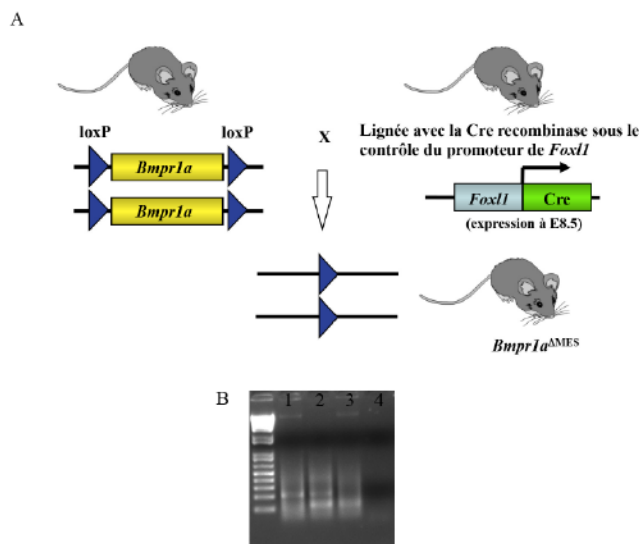


Figure 21. Détermination du génotype de la lignée de souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

(A) Représentation du système CreloxP utilisé pour la délétion conditionnelle de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes (ΔMES). Migration sur gel d'agarose des amplicons de PCR pour le génotypage des lignées de souris *Bmpr1a* (B) et *FoxL1Cre* (C). (B) Pour le génotype *Bmpr1a*, le puits 1 correspond au génotype homozygote pour les allèles loxP, le puits 2 est un hétérozygote (loxP/+), le puits 3 est une souris de type sauvage et le puits 4 est un contrôle négatif sans amplification.

3.2.2 Validation de la perte d'expression de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes

Étant donné que la population de cellules visée par la délétion représente une infime proportion des cellules de la muqueuse, il fut impossible de quantifier de façon significative la délétion du gène *Bmpr1a* spécifiquement dans les myofibroblastes. La validation de la perte de la signalisation des Bmps a été effectuée par une expérience de co-immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre pSmad1-5-8 et un anticorps contre α SMA. De ce fait, l'activation de la voie de signalisation des Bmps est visualisée par le marquage nucléaire de l'anticorps pSmad1-5-8 et les myofibroblastes sont distingués grâce à l'anticorps α SMA qui permet de les localiser immédiatement sous-jacents aux cellules épithéliales. La protéine α SMA est exprimée par différents types cellulaires au niveau du côlon, comme les myofibroblastes, les péricytes et les deux types de cellules musculaires retrouvés dans la *Muscularis Mucosae* et la *Muscularis* (Mifflin *et al.*, 2011). Ces différents types cellulaires ont tous des localisations spécifiques qui permettent d'utiliser l'expression de l' α SMA pour visualiser les myofibroblastes qui sont le seul type exprimant cette protéine et localisé spécifiquement sous-jacent aux cellules épithéliales. Dès 30 jours d'âge, les souris contrôles démontrent une activation de la voie des Bmps dans la plupart des cellules épithéliales non-prolifératives (nucléaires, vert) ainsi que dans la majorité des cellules myofibroblastiques (α SMA positives, rouge) ainsi que dans d'autres types de cellules mésenchymateuses. Les souris *Bmpr1a* ^{Δ MES}, au même stade, présentent des régions où les myofibroblastes (α SMA positives, rouge) et autres cellules mésenchymateuses démontrent une inactivation de la voie suggérant qu'ils ont bien subi la délétion du gène *Bmpr1a* (Figure 22A). Afin de valider que cette inactivation de la voie de signalisation des Bmps était bel et bien due à la perte du gène, la recombinaison du gène *Bmpr1a* par la Cre a été visualisée par un PCR utilisant des amorces spécifiques à la région recombinée. Ainsi, l'apparition d'une bande spécifique sur gel d'agarose permet de confirmer qu'il y a bel et bien eu recombinaison du gène *Bmpr1a* permettant la délétion de sa protéine et l'inhibition de sa signalisation. Afin de s'assurer que la délétion était aussi spécifique au compartiment mésenchymateux, des enrichissements d'épithéliums et de mésenchymes, des côlons de souris contrôles et expérimentales de 30 jours, ont été effectués par la technique de

MatriSpense. Le PCR avec les amorces spécifiques pour la région recombinée met en évidence qu'aucune recombinaison du gène *Bmpr1a* n'a eu lieu dans les deux compartiments (épithélium et mésenchyme) du côlon des souris contrôles. Chez les souris expérimentales, on observe la présence d'une bande à 180pb correspondant à la région recombinée par la Cre, uniquement dans les extraits de mésenchyme enrichis et non dans l'épithélium (Figure 22B). Ceci vient appuyer le résultat précédent démontrant que la recombinaison de la Cre a vraiment eu lieu dans le compartiment mésenchymateux et corrèle avec le fait que les myofibroblastes ne possèdent plus d'activation de la signalisation des Bmps dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

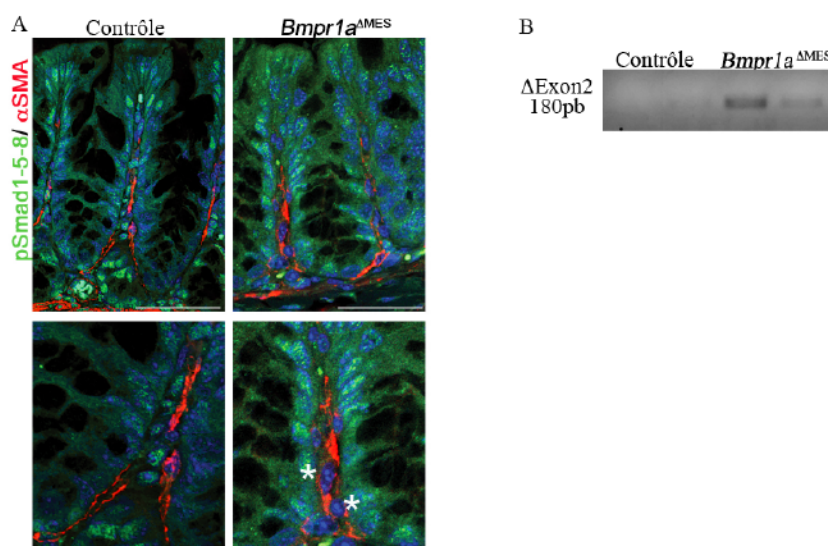


Figure 22. Validation de la perte d'expression de *Bmpr1a* au niveau du mésenchyme colique.

A) L'expérience de co-marquage par immunofluorescence avec des anticorps contre α -Sma (signal en rouge) et contre phospho-Smad1-5-8 (signal en vert) permet de visualiser spécifiquement l'activation de la signalisation des Bmps dans les cellules myofibroblastiques du côlon des souris contrôles de 30 jours. Le co-marquage chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} révèle une perte d'activation de la voie (diminution du signal vert nucléaire) dans les myofibroblastes spécifiquement (astérisques blancs) comparativement aux contrôles. Des images à plus fort grossissement sont représentées dans les panneaux du bas. Les barres d'échelles représentent 50 μ m. B) La délétion du gène *Bmpr1a* est vérifiée par une analyse par PCR sur des extraits similaires provenant de côlon de souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES}. L'ADN génomique extrait des enrichissements de mésenchyme et d'épithélium permet de vérifier, sur gel d'agarose, la recombinaison spécifique des allèles loxP effectuée par la Cre sur l'ADN génomique (bande de 180pb). Les deux premiers puits représentent l'ADN génomique du mésenchyme de deux souris contrôles distinctes dans lesquelles on ne voit aucune amplification représentant la recombinaison du gène *Bmpr1a*. Les deux derniers puits démontrent l'amplification de l'allèle loxP du gène *Bmpr1a* recombinée dans le mésenchyme de la souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

3.2.3 Observations macroscopiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMes}

Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} vont naître dans un ratio mendélien attendu et vont croître de façon normale jusqu'à environ l'âge de 6 mois. Entre six et neuf mois, on observe des apparitions de prolapsus rectaux chez 70% des souris expérimentales comparativement à aucun chez les contrôles (Figure 23A). La définition des prolapsus rectaux est en fait le relâchement des ligaments et muscles du rectum permettant l'extériorisation par l'anus du tube digestif. Ces prolapsus rectaux sont une caractéristique retrouvée dans diverses pathologies digestives et ils sont souvent associés soit à une forte diarrhée ou à une obstruction du côlon. L'analyse macroscopique des côlons des souris possédant des prolapsus rectaux, et âgées entre 9 mois et 1 an, a permis de révéler un phénomène de polypose important ayant lieu dans le côlon moyen des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. En effet, la photographie et la micrographie des colorations H&E de côlon mettent en évidence le nombre de polypes retrouvés dans la muqueuse des souris expérimentales (Figure 23B). Le nombre de polypes a été compté grâce à l'utilisation du bleu de méthylène dans le côlon entier des souris contrôles et souris *Bmpr1a*^{ΔMES} (Figure 23C).

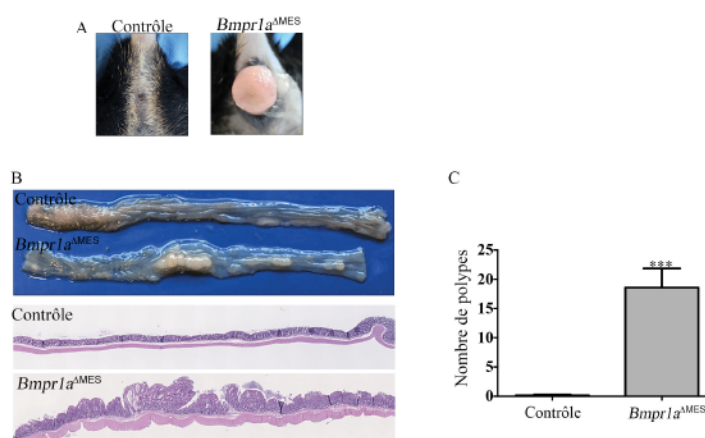


Figure 23. Apparition de prolapsus rectaux et de polypes dans la muqueuse colique des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an.

(A) Les photographies des rectums des souris de 1 an démontrent la présence de prolapsus rectaux dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} en comparaison à aucun dans les contrôles. (B) Les analyses macroscopiques du côlon (photos) et les micrographies des colorations H&E révèlent la présence de polypes bénins, principalement dans le côlon moyen, des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an comparativement à aucun dans les contrôles du même âge. (C) Le décompte du nombre de polypes démontre la constance du résultat avec une moyenne de 17,65 polypes chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comparativement à 0 pour les contrôles. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p < 0.05, selon le test T de Student, n=12 souris.

3.2.4 Effet de la perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse sur l'architecture du côlon

Des colorations H&E ont été effectuées sur les côlons des souris contrôles et des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 et 365 jours. Une architecture colique normale est retrouvée dans le côlon des deux lignées murines, et ce, aux deux âges analysés. Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, dès 90 jours, démontrent des régions dysplasiques au niveau de leur côlon moyen (Figure 24A). Ces régions se retrouvent plus nombreuses et plus affectées avec l'âge (de 90 à 270 jours), comme le démontre le graphique du compte des régions dysplasique retrouvées par côlon (Figure 24C). De plus, il est à noter que ces régions dysplasiques ont été analysées par une vétérinaire pathologiste, Dre Marilène Paquet, Université de Montréal. Elle caractérise ces régions d'architecture anormale comme possédant un élargissement du compartiment mésenchymateux, une infiltration immunitaire ainsi que de l'hyperplasie épithéliale avec des abcès de cryptes. Ces régions dysplasiques se transforment en polypes, vers l'âge de un an. Ces polypes furent analysés par la même vétérinaire pathologiste, Dre Marilène Paquet et ils comportent les mêmes caractéristiques que les régions dysplasiques (Figure 24B).

Il est aussi important de préciser que le phénotype et la délétion s'effectue vraiment de façon mosaïque, c'est-à-dire que l'on retrouve dans toutes les souris expérimentales des régions qui seront affectées et des régions qui seront non-affectées. De plus, systématiquement, à chaque analyse effectuée, les régions normales dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} se comportaient identiquement aux souris contrôles. Ainsi, pour rendre l'interprétation des résultats plus aisée à comprendre, les analyses seront réalisées sur les régions dysplasiques et seront comparées aux souris contrôles. Tout en considérant que les régions non-dysplasique chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} donnent le même résultat que les souris contrôles.

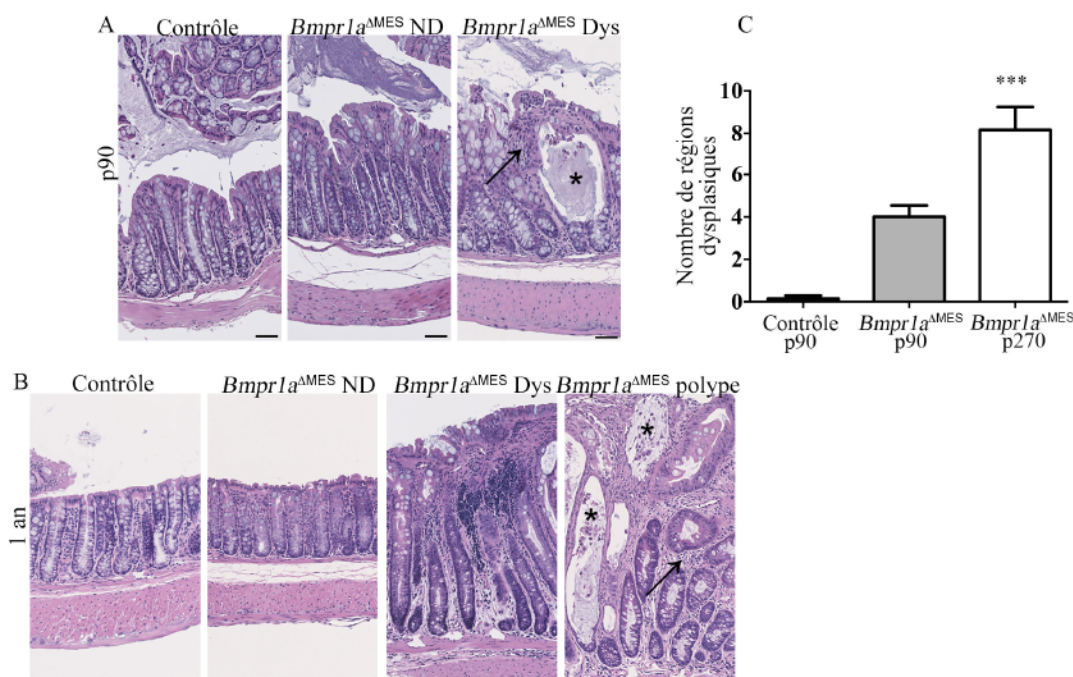


Figure 24. Impact de la délétion de *Bmpr1a* sur l'architecture des glandes coliques.

(A) Des colorations H&E ont été effectuées sur des coupes histologiques, en paraffine, de côlons de souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent la présence de régions dysplasiques et de régions de muqueuse non-affectée le long de leur côlon. Comparativement aux souris contrôles et aux régions normales, les régions dysplasiques comportent une hyperplasie de l'épithélium, des abcès de cryptes (astérisque noir) et une expansion du mésenchyme avec infiltration immunitaire (flèche noire). (B) Ces mêmes colorations ont été effectuées pour les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an. Les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent les mêmes caractéristiques que les régions dysplasiques des souris plus jeunes (astérisque et flèche noirs). Des régions avec glandes coliques normales ainsi que des régions affectées sont retrouvées chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comparativement aux souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50µm. (C) Le nombre de régions dysplasiques a été déterminé par le compte sur les H&E des côlons complets. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, ***p < 0.001 selon le test ANOVA à 2 voies, n= 6 souris. ND : région non-dysplasique, Dys : région dysplasique.

3.2.5 Effet de la perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse sur la prolifération et l'apoptose.

Des immunofluorescences dirigées contre PCNA (*Proliferating Cells Nuclear Antigen*) ont été utilisées afin d'analyser la prolifération dans les deux compartiments cellulaires de la

muqueuse. Les cellules prolifératives sont visualisées en vert et le rouge est une contre-coloration au bleu d'Evans pour mieux discerner l'architecture du tissu. Un nombre similaire de cellules prolifératives est retrouvé dans l'épithélium des souris contrôles, mais aussi dans l'épithélium des régions non-dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. De plus, des résultats semblables sont obtenus pour les cellules prolifératives du mésenchyme du côlon des mêmes souris. Toutefois, les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent un plus grand nombre de cellules prolifératives dans les deux compartiments (Figure 25A). En effet, les comptes des cellules PCNA positives ont révélé une augmentation de 1.9 fois de la prolifération épithéliale et de 6.1 fois de la prolifération mésenchymateuse des régions dysplasiques (Figure 25C). De plus, l'augmentation de la prolifération cellulaire, autant au niveau épithéliale que mésenchymateux, a été confirmée dans les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an, comparativement aux souris contrôles du même âge (Figure 25B).

L'apoptose est un processus cellulaire qui est souvent modulé dans le cas de dysplasie ou de cancer, soit en étant augmenté pour permettre de diminuer l'apparition de cellules mutées mais aussi en étant diminué pour favoriser la survie des cellules cancéreuses. C'est pourquoi, il était important de vérifier l'apoptose dans les souris mutantes grâce à l'essai TUNEL. Ce test a été effectué par immunofluorescence, sur des coupes en paraffine de côlons de souris âgées de 90 jours et de 1 an. L'essai TUNEL permet de révéler les cellules apoptotiques normalement retrouvées au niveau de l'épithélium de surface du côlon. Les souris contrôles de 90 jours démontrent des cellules apoptotiques retrouvées de façon normale dans certaines cellules épithéliales de surfaces (Figure 26A). Les régions dysplasiques de ces jeunes souris expérimentales démontrent une augmentation ainsi qu'une dispersion des cellules apoptotiques épithéliales et mésenchymateuses. Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an, comparativement à la muqueuse normale des contrôles, présentent des polypes dans lesquels les cellules apoptotiques sont augmentées et délocalisées, et ce autant dans l'épithélium que le mésenchyme (Figure 26B). De plus, les décomptes et les analyses statistiques ont permis de démontrer les variations significatives entre le nombre de cellules apoptotiques des régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comparativement aux souris contrôles de 90 jours. (Figure 26C).

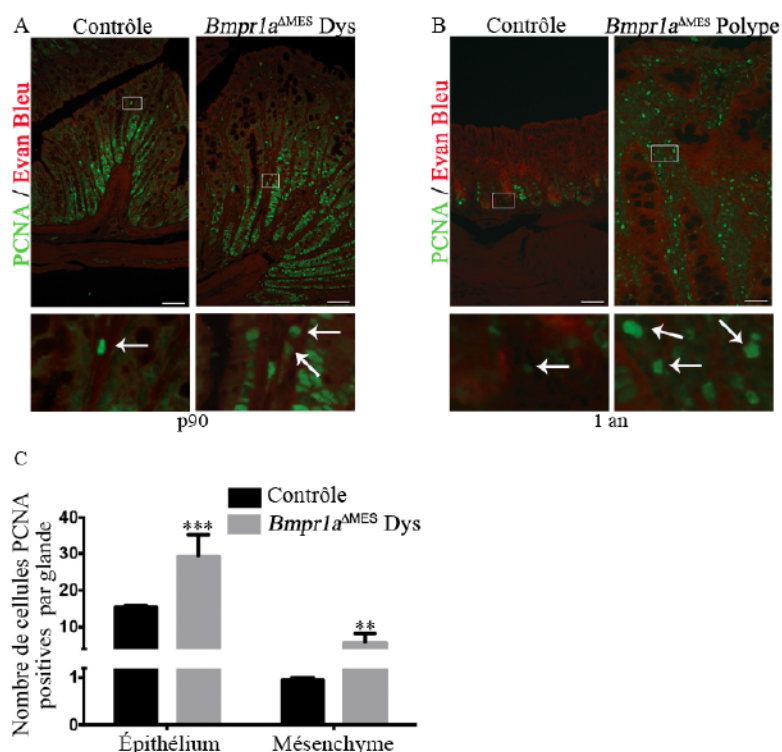


Figure 25. Analyse de la prolifération chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

(A) Les tests de prolifération sont effectués en utilisant un anticorps dirigé contre le PCNA permettant de visualiser les cellules prolifératives, en vert. Le bleu d'Evan's permet une contrecoloration du tissu en rouge. Chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} et contrôles de 90 jours, des cellules PCNA positives sont retrouvées dans la moitié du fond des glandes coliques et dispersées dans le mésenchyme. Des images à plus fort grossissement sont représentées dans les panneaux du bas. (B) La prolifération a été visualisée dans le côlon des souris âgées de 1 an. Les cellules prolifératives sont retrouvées dans la moitié du fond des glandes coliques et dispersées dans le mésenchyme des souris contrôles. Les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent un grand nombre de cellules prolifératives mésenchymateuses dispersées dans la muqueuse. Des images à plus fort grossissement sont représentées dans les panneaux du bas pour mieux visualiser les cellules mésenchymateuses prolifératives (flèches blanches). Les barres d'échelles représentent 50 μm. (C) Le décompte du nombre de cellules PCNA positives des côlons révèle une augmentation significative de la prolifération des cellules épithéliales autant que mésenchymateuses, des régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comparativement aux contrôles. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, **p < 0.01 et ***p < 0.001 selon le test ANOVA à 2 voies, n=6 souris.

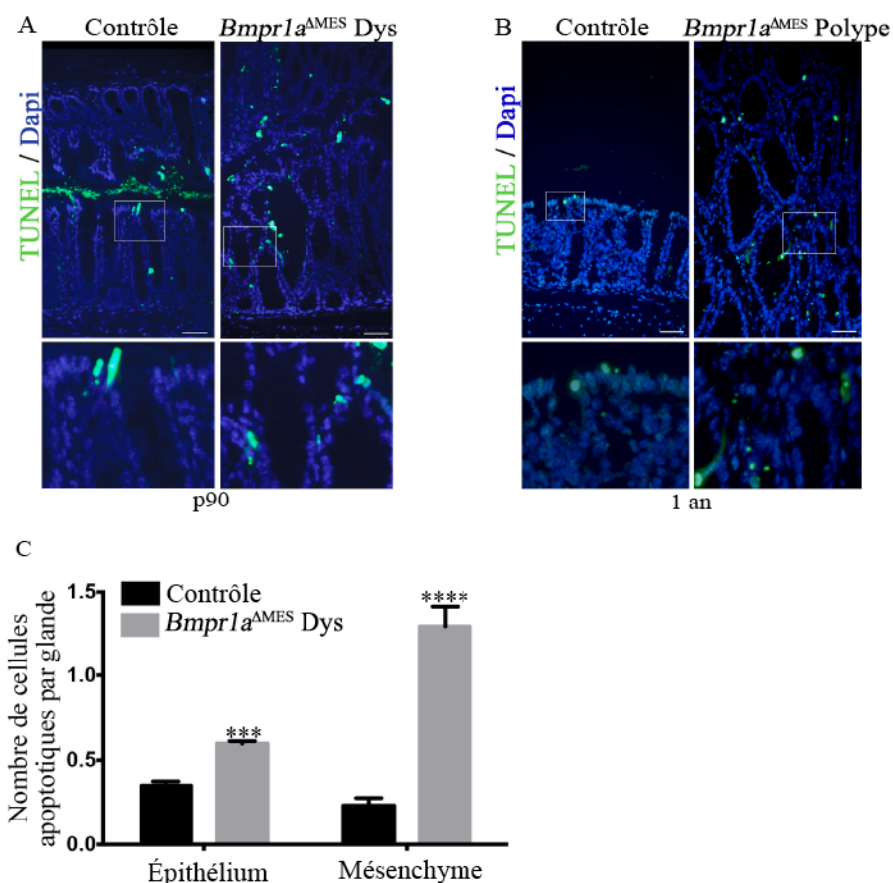


Figure 26. Analyse de l'apoptose chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

(A) L'apoptose est visualisée par un essai TUNEL qui marque les cellules apoptotiques, en vert, sur des sections de côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES}. Les cellules apoptotiques sont retrouvées à l'épithélium de surface des souris contrôles mais délocalisées et dans certaines cellules mésenchymateuses des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Des images à plus fort grossissement sont représentées dans les panneaux du bas. (B) L'essai TUNEL a été effectué sur les côlons des souris âgées de 1 an démontrant le nombre de cellules apoptotiques dans l'épithélium et le mésenchyme de ces deux types de souris. Des images à plus fort grossissement sont représentées dans les panneaux du bas. Les barres d'échelles représentent 50μm. (C) Des décomptes des cellules TUNEL positives révèlent une différence significative du nombre de cellules apoptotiques entre les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *** $p < 0.001$ selon le test ANOVA à 2 voies, $n=6$ souris.

3.2.6 Effet de la perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse sur l'élargissement du compartiment mésenchymateux.

Puisque cette modulation de la prolifération pourrait être associée à un remodelage des composants du mésenchyme (Beacham et Cukierman, 2005; Taddei *et al.*, 2013), les différents types cellulaires mésenchymateux ont été analysés par des expériences de co-

marquages. Des immunofluorescences ont été effectuées en utilisant simultanément deux anticorps dont un dirigé spécifiquement contre la vimentine et le deuxième dirigé contre l' α SMA. Cette expérience permet de visualiser les fibroblastes, en vert, puisqu'ils expriment uniquement la vimentine. Elle permet aussi de visualiser les cellules de muscles lisses, en rouge, qui expriment fortement l' α SMA. Finalement, les myofibroblastes sont pour leur part visualisés en jaune/orange puisqu'ils expriment à la fois la vimentine et l' α SMA. Ces différents types cellulaires mésenchymateux sont retrouvés de façon normale, sous-jacents aux cellules épithéliales, chez les souris contrôles et dans les régions non-dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours (Figure 27A). À ce stade, dans les régions dysplasiques des souris expérimentales, les cellules mésenchymateuses (fibroblastes et myofibroblastes) sont retrouvées en proportion plus grande que les régions dites normales. Des décomptes cellulaires, du nombre de fibroblastes et de myofibroblastes, permettent de mettre en évidence l'augmentation de 1.3 fois du nombre de fibroblastes (13,95 vs 18,14) et de façon plus importante de 2 fois le nombre de myofibroblastes (6,02 vs 12,1) dans les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comparativement au nombre retrouvé dans les régions normales des mêmes souris ou dans le côlon des souris contrôles (Figure 27B). Afin de vérifier si cette modification du nombre de cellules mésenchymateuses était toujours présente dans les polypes, l'expérience de co-immunofluorescence a été effectuée sur les côlons des souris âgées de 1 an. Les souris contrôles et les régions non affectées démontrent un marquage et une localisation normale des fibroblastes (vimentine+, vert), des cellules de muscles lisses (α SMA+, rouge) et des myofibroblastes (vimentine+, α SMA+, jaune/orange). On remarque dans les polypes une grande augmentation de la composition mésenchymateuse avec une amplification du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes (Figure 27C). De plus, les myofibroblastes semblent démontrer une plus grande expression de α SMA, puisqu'ils sont beaucoup plus orangés que ceux retrouvés dans les contrôles. Cela suggère que les myofibroblastes retrouvés dans les polypes seraient plus activés et actifs qu'à l'état homéostatique et ils pourraient favoriser le développement d'un mésenchyme réactif (Otranto *et al.*, 2012).

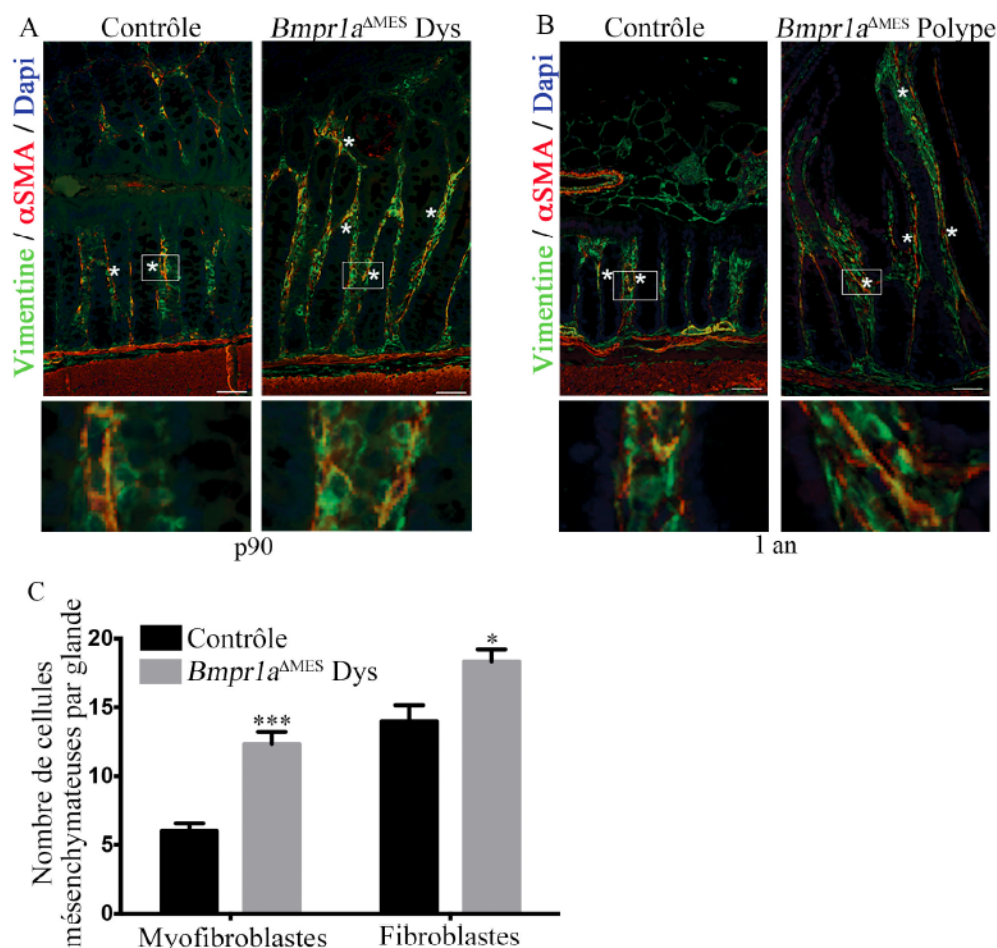


Figure 27. Localisation des différents types de cellules mésenchymateuses.

(A) Les immunofluorescences simultanées contre αSMA (marquage rouge, positif pour les cellules de muscles lisses et les myofibroblastes) et vimentine (marquage vert, positif pour les fibroblastes et les myofibroblastes) ont été effectuées sur les sections en paraffine des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. Les myofibroblastes (jaunes, astérisques blancs), les fibroblastes (verts) et les cellules de muscle lisses (rouges) sont retrouvés dans le mésenchyme des souris contrôles et expérimentales. (B) Le même co-marquage a été effectué sur les côlons des souris âgées de 1 an. Une localisation normale de ces types cellulaires est retrouvée chez les contrôles. Les régions polypoides des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une expansion du nombre de fibroblastes et de myofibroblastes composant le mésenchyme. Les barres d'échelles représentent 50μm. (C) Le compte du nombre de cellules doublement marquées relativement au nombre de cellules simplement marquées démontre l'augmentation du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes dans les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p < 0.05 et ***p < 0.001 selon le test ANOVA à 2 voies, n=6 souris.

Les myofibroblastes étant grandement augmentés dans les régions dysplasiques et les polypes des souris expérimentales, il était nécessaire de vérifier si ces cellules

possédaient toujours l'inactivation de la voie de signalisation des Bmps. Pour ce faire, la même technique de co-marquages par immunofluorescence, utilisée à la Figure 22, a été utilisée sur les côlons des souris âgées de 90 jours et 1 an. L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre phosphoSmad1-5-8 et α SMA permet de visualiser l'activation de la signalisation dans les myofibroblastes spécifiquement. Tout d'abord, de façon surprenante, dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours, on voit qu'une proportion plus importante de myofibroblastes plus abondants dans les régions dysplasiques possèdent toujours l'activation de la voie de Bmps, démontrée par la présence du marquage nucléaire vert (Figure 28A). Ce marquage est retrouvé de façon similaire dans les souris contrôles et les régions non-dysplasiques des souris expérimentales, comme précédemment démontré dans les souris âgées de 30 jours (Figure 22). Des décomptes de ces myofibroblastes marquées positivement avec phospho-Smad1-5-8 démontrent que l'on ne retrouve plus de façon significative la perte de signalisation des Bmps à 90 jours (Figure 28B). De plus, dans les polypes des souris de 1 an, la majorité des myofibroblastes qui sont grandement augmentés dans les polypes sont phosphoSmad1-5-8 positifs démontrant qu'ils ne possèdent plus l'inactivation de la voie de Bmps, démontrée par la persistance du marquage nucléaire vert dans les myofibroblastes (Figure 28C). Ce résultat suggère que malgré la délétion en bas âge et le phénotype important obtenu avec les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, la délétion de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes est perdue avec le temps.

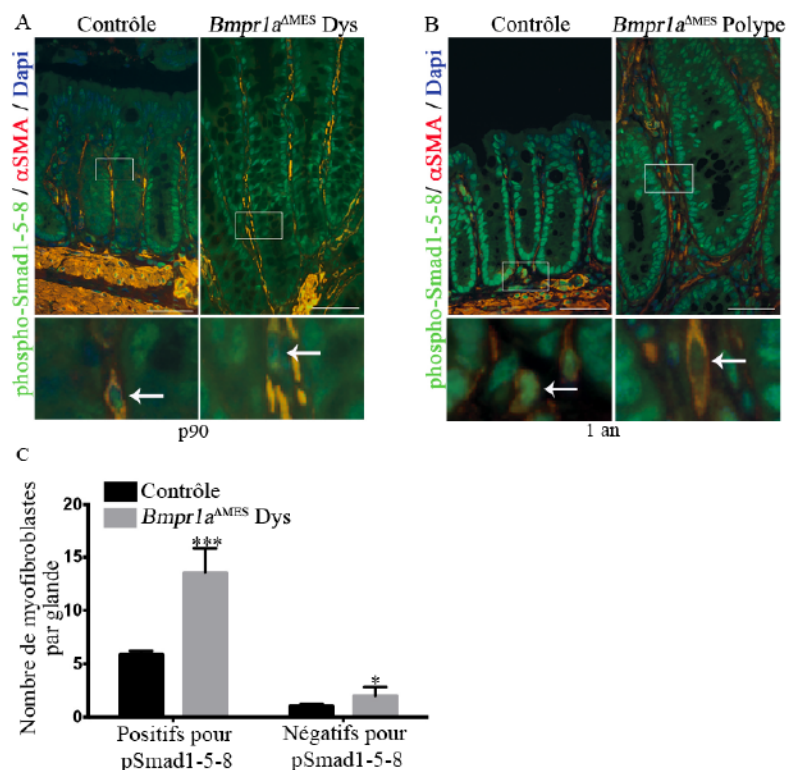


Figure 28. Activation de la signalisation des Bmps dans les cellules mésenchymateuses. (A) Les immunofluorescences simultanées contre αSMA (signal rouge sub-épithélial, positif pour les myofibroblastes) et phosphoSmad1-5-8 (signal vert, positif pour les fibroblastes et les myofibroblastes) ont été effectuées sur les sections en paraffine de côlons isolés des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. Cela permet de visualiser spécifiquement l'activation de la signalisation des Bmps dans les cellules myofibroblastiques du côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} (flèches blanches). (B) L'expérience de co-marquage sur les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an révèle une grande augmentation de myofibroblastes avec l'activation de la voie (signal vert nucléaire) dans les polypes comparativement aux contrôles. (C) Le compte des cellules doublement marquées, dans les souris âgées de 90 jours, démontre aucune inhibition significative de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes retrouvés dans les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, **p* < 0.05 et ****p* < 0.001 selon le test ANOVA à 2 voies, *n*=6 souris. Les barres d'échelles représentent 50μm.

3.2.7 Effet de la perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse sur le remodelage de la matrice extracellulaire.

Les myofibroblastes sont des cellules essentielles pour produire les différents éléments composant la matrice extracellulaire (Powell *et al.*, 1999a). Le fait d'avoir un nombre atypique de myofibroblastes peut contribuer à produire et modifier la composition des éléments de la matrice rendant le mésenchyme plus réactif. De plus, il est connu qu'un

remodelage massif de la matrice extracellulaire ainsi que la dérégulation des niveaux de cytokines et de facteurs de croissance sont des caractéristiques de ce mésenchyme réactif qui va contribuer à créer un microenvironnement toxique pour les cellules épithéliales (Glaire *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2012; Taddei *et al.*, 2013). Il est donc intéressant de regarder quelle est la composition spécifique de la matrice extracellulaire dans les souris expérimentales.

Une immunofluorescence utilisant un anticorps spécifique contre les fibres de collagène I permet de les visualiser en vert. Cette expérience a été effectuée sur les lames en paraffine des côlons de souris contrôles et expérimentales âgées de 3 mois et 1 an. Cette protéine est retrouvée de façon normale autour des cellules mésenchymateuses et ce autant dans les côlons contrôles que dans les régions non dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} (Figure 29A, B). À 3 mois, les régions dysplasiques démontrent une augmentation de la déposition de fibres de collagène I (Figure 29A). Ce phénotype est aussi retrouvé et encore plus indéniable dans les polypes des souris expérimentales de 1 an (Figure 29B).

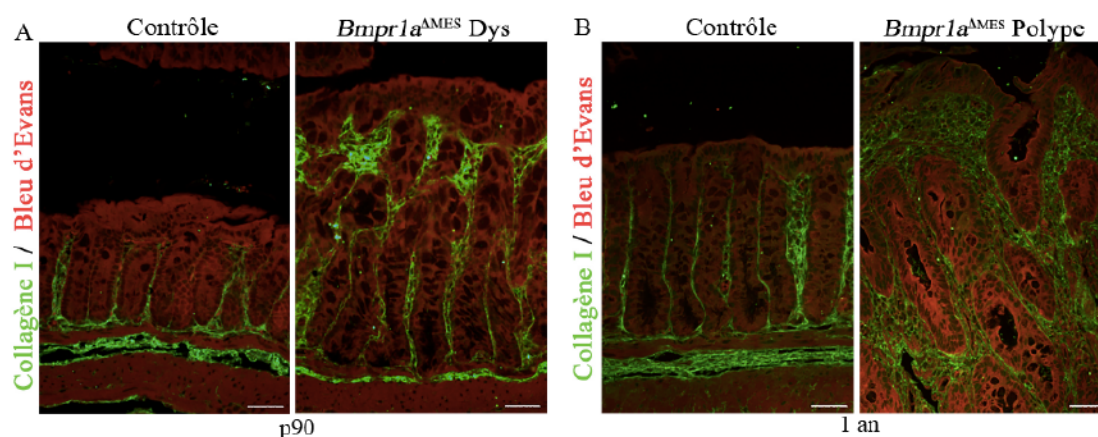


Figure 29. Visualisation de la déposition de collagène I.

(A) Une immunofluorescence utilisant un anticorps contre la protéine collagène I démontre une localisation principale à la membrane basale et dans la sous-muqueuse des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours. Les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une accumulation anormale sous les cellules épithéliales de surface. (B) L'immunofluorescence dirigée spécifiquement contre le collagène I, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an, démontre son accumulation intense dans les polypes comparativement à sa localisation normale dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm.

Les fibres de collagène IV ont aussi été visualisées par la même technique et sur des cohortes de souris similaires. Les souris contrôles et expérimentales, dans leurs régions non-dysplasiques, démontrent la localisation de la déposition de collagène IV dans les endroits attendus, entourant les cellules mésenchymateuses (Figure 30A). Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours démontrent une localisation normale des fibres de collagène. Toutefois, la déposition du collagène IV est grandement augmentée dans les régions dysplasiques de ces jeunes souris (Figure 30A). Les polypes des souris expérimentales de 1 an possèdent aussi une quantité abondante de collagène IV, comparativement aux régions non-affectées des mêmes souris ou des souris contrôles (Figure 30B).

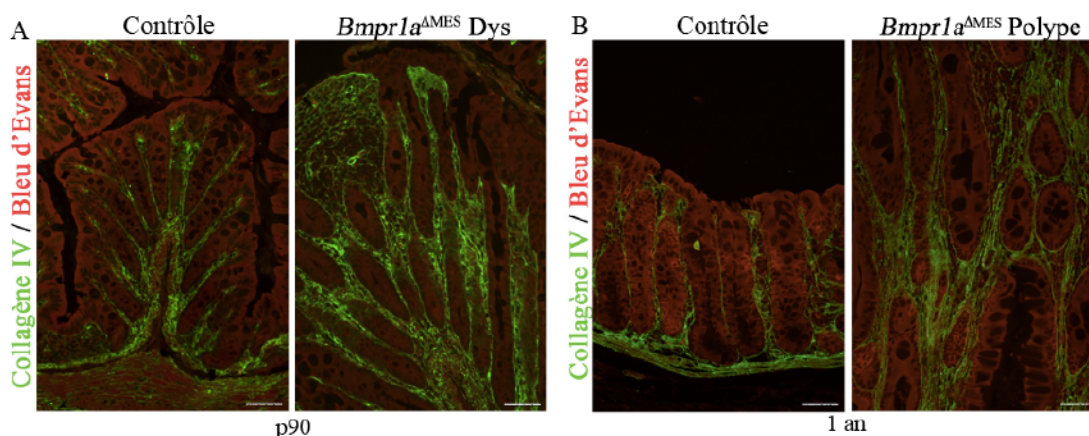


Figure 30. Visualisation de la déposition de collagène IV.

(A) Une immunofluorescence utilisant un anticorps contre la protéine collagène IV démontre une localisation principale au niveau du mésenchyme de la muqueuse des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours. Les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une accumulation anormale entre les cryptes et sous les cellules épithéliales à la surface de la lumière colique. (B) L'anticorps fluorescent dirigé spécifiquement contre le collagène IV, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an, démontre son accumulation intense dans les polypes comparativement à sa localisation normale dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm.

Une autre composante importante de la matrice extracellulaire est la fibronectine qui sert de lien entre les différentes fibres de collagène et les cellules épithéliales (White *et al.*, 2008). Cette protéine fut visualisée de façon similaire par des immunofluorescences utilisant un anticorps dirigé spécifiquement contre la fibronectine sur des lames de paraffine de côlons de souris de 3 mois et 1 an. Les résultats obtenus sont très comparables aux fibres de collagène. Il y a une plus grande quantité de fibronectine dans les régions dysplasiques (Figure 31A) et dans les polypes (Figure 31B) des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, âgées

de 90 jours et 1 an respectivement, comparativement aux souris contrôles. Ensemble ces résultats démontrent que la délétion de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes engendre une modification importante des éléments de la matrice extracellulaire par une plus grande quantité produite de ces protéines.

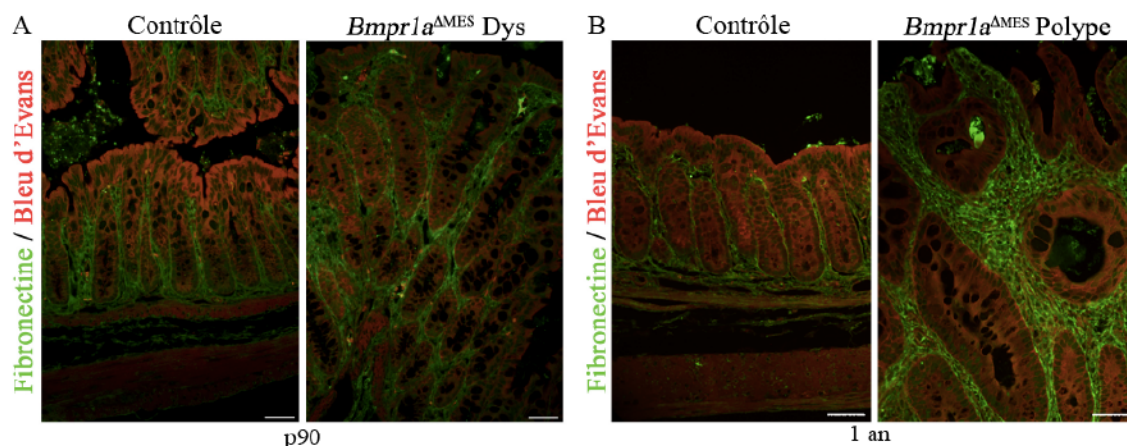


Figure 31. Visualisation de la déposition de fibronectine.

(A) Une immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre la protéine fibronectine démontre une localisation principale au niveau du mésenchyme de la muqueuse des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours. Les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une accumulation anormale sous les cellules épithéliales de surfaces et dans le fond des cryptes. (B) L'anticorps fluorescent dirigé spécifiquement contre la fibronectine, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} de 1 an, démontre son accumulation dans le mésenchyme des polypes comparativement à sa localisation normale dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm.

Certains autres éléments pouvant affecter la matrice extracellulaire ont été analysés par immunobuvardage. Entre autres, les différentes protéases permettant la dégradation des protéines de la matrice, comme les MMPs ainsi que certains glycosaminoglycans, comme le syndécan-1. Les analyses ont été effectuées sur des extraits protéiques de côlon moyen de souris contrôles et expérimentales âgées de 90 jours (Figure 32A). Les immunobuvardages des différentes protéines démontrent une diminution de l'expression protéique de la MMP3, une stroméolysine responsable de la dégradation du collagène I et IV, dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. De plus, on observe une diminution des formes glycosylées de syndécan1 dans ces mêmes souris, sans toutefois voir des modulations dans l'expression du précurseur. Les protéines épithéliales E-cadhérine et β-caténine ne sont pas modulées comparativement aux souris contrôles, ainsi que l'actine servant de contrôle de chargement. Ce résultat démontre de la constance entre chacun de nos extraits. Les

modulations observées ont été confirmées par des analyses densitométriques et statistiques comme le démontre le graphique de la Figure 32B.

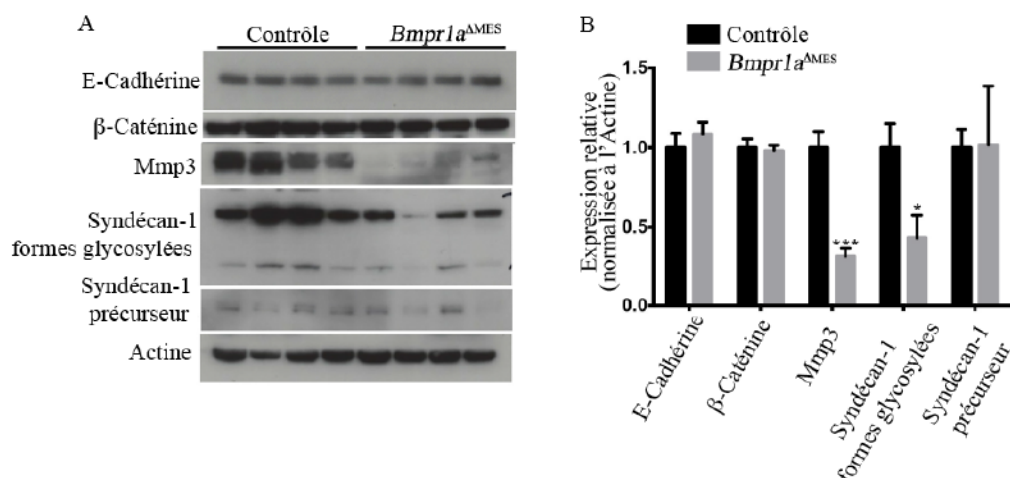


Figure 32. Expression des protéines du mésenchyme chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. (A) Les immunobuvardages ont été effectués sur les extraits totaux de côlon des souris contrôles ou *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 90 jours. L'expression protéique de la E-cadhérine, β-caténine, MMP3, syndécan-1 et l'actine a été déterminée par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chacune des protéines. (B) L'expression relative de ces protéines a été déterminée par densitométrie, en utilisant le logiciel ImageJ. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p < 0.05, ***p < 0.001 selon le test T de Student, n= 4 souris.

3.2.8 La perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse entraîne une infiltration de cellules immunitaires.

Le mésenchyme réactif engendre des modifications importantes du microenvironnement et est aussi caractérisé par la présence de cytokines et de cellules immunitaires. Les analyses histologiques précédentes ont révélé une infiltration de cellules immunitaires associée au phénotype dysplasique des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Des immunohistochimies utilisant des marqueurs spécifiques pour les différents types de cellules immunitaires ont permis d'en démontrer leur présence. Ces marquages ont été effectués sur les lames en paraffine de côlons des souris de 3 mois ainsi que ceux de 1 an, en utilisant ces différents anticorps primaires dirigés contre ces protéines : CD68 pour les macrophages, myéloperoxidase (MPO) pour les neutrophiles, CD3 pour les lymphocytes T et CD45R pour les lymphocytes B. Premièrement, dès 3 mois, les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une augmentation du nombre de cellules marquées avec

CD68 comparativement aux souris contrôles (Figure 33A). Les polypes démontrent une forte infiltration de macrophages comparativement aux souris contrôles ou aux régions saines des mêmes souris (Figure 33B). Les décomptes des cellules CD68+ confirment l'augmentation du nombre de macrophages dans les régions dysplasiques et les polypes comparativement aux souris contrôles et aux régions non-affectées des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} (Figure 33C).

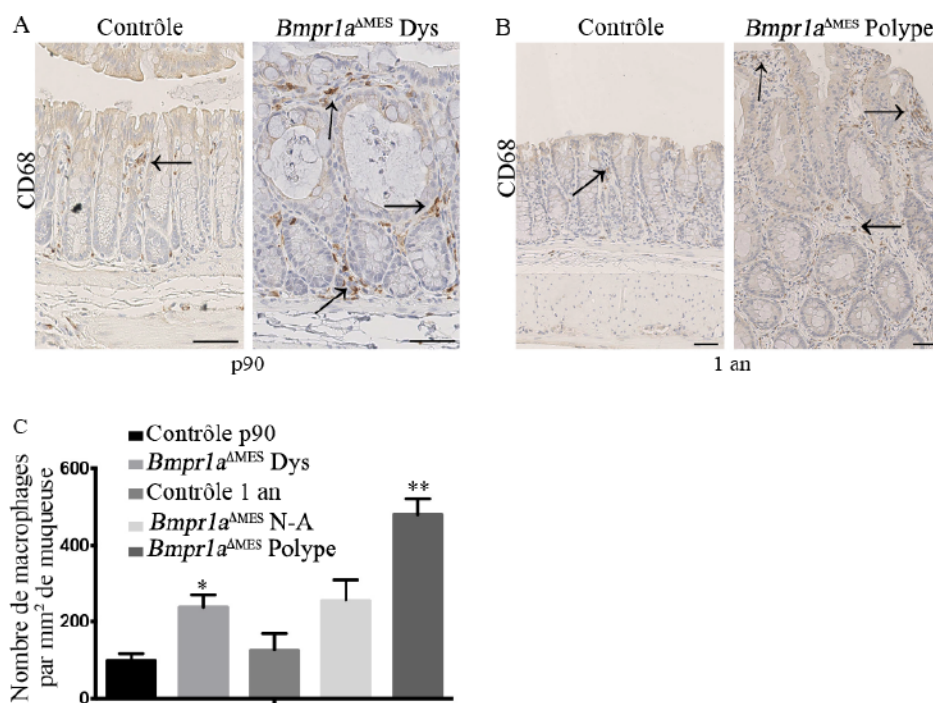


Figure 33. Localisation de cellules immunitaires de type macrophage.

(A) Une immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la protéine CD68 démontre la présence de quelques macrophages (flèches noires) au niveau de la muqueuse des souris contrôles âgées de 90 jours. Les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent un plus grand nombre de cellules positives sous les cellules épithéliales de surface et dans le fond des cryptes. (B) L'immunohistochimie dirigée spécifiquement contre CD68, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an, démontre l'accumulation des macrophages dans le mésenchyme des polypes comparativement à leur présence limitée dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm. (C) Le compte des cellules marquées pour CD68 démontre une infiltration significative des macrophages dans les régions dysplasiques et les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p < 0.05, **p < 0.01 selon le test ANOVA à 2 voies, n= 6 souris. Dys = régions dysplasiques, N-A = régions non-affectées.

Les neutrophiles, un autre types de cellules immunitaires provenant de la lignée myéloïde, sont retrouvés augmentés dans les régions affectées et les polypes de souris

Bmpr1a^{ΔMES} âgées de 3 mois et 1 an respectivement (Figure 34A, B). En effet, on retrouve un plus grand nombre de cellules MPO positives dans les régions affectées versus les régions non-affectées ou les souris contrôles (Figure 34C).

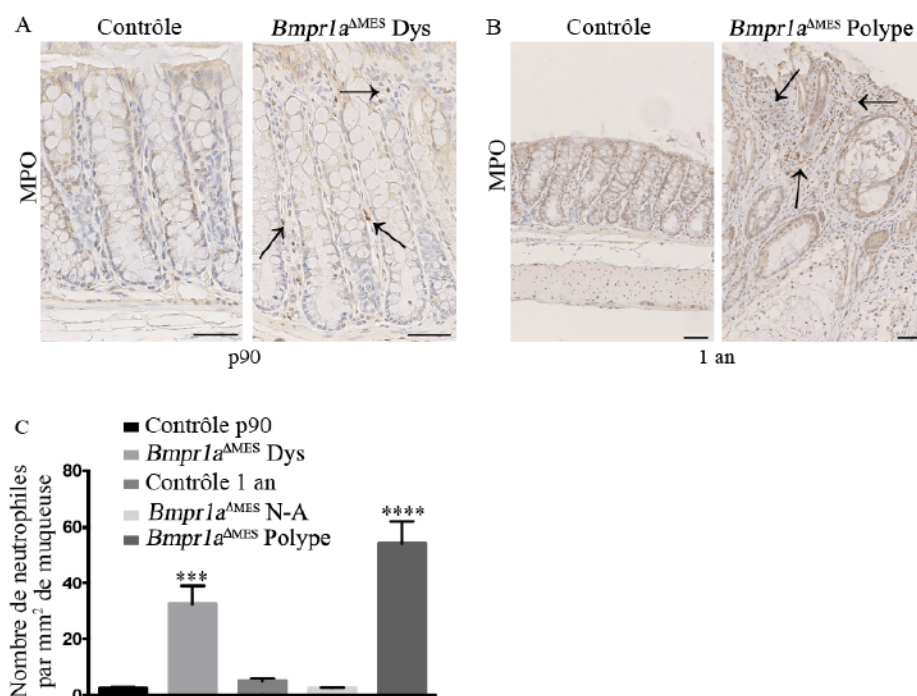


Figure 34. Localisation de cellules immunitaires de types neutrophiles.

(A) Une immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la protéine MPO démontre la présence de quelques neutrophiles (flèches noires) au niveau de la muqueuse des régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} contrairement aux souris contrôles âgées de 90 jours qui démontrent aucun neutrophiles dans leur muqueuse. (B) L'anticorps dirigée spécifiquement contre MPO, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an, démontre l'accumulation des neutrophiles dans le mésenchyme des polypes comparativement à leur absence dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm. (C) Le compte des cellules marquées pour MPO démontre une infiltration significative des neutrophiles dans les régions dysplasiques et les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, ***p < 0.001 et ****p < 0.0001 selon le test ANOVA à 2 voies, n=6 souris. Dys = régions dysplasiques, N-A = régions non-affectées.

Les immunohistochimies utilisant un anticorps contre le CD3 retrouvé à la surface des lymphocytes T ont permis de démontrer que ce type cellulaire était grandement induit dans nos souris expérimentales, et ce, autant dans les jeunes souris de 90 jours que dans celles développant de la polyposé à 1 an (Figure 35A, B). Les décomptes confirment l'augmentation marquée et significative du nombre de lymphocytes T dans les régions

dysplasiques et les polypes comparativement aux souris contrôles et aux régions non-affectées des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} (Figure 35C).

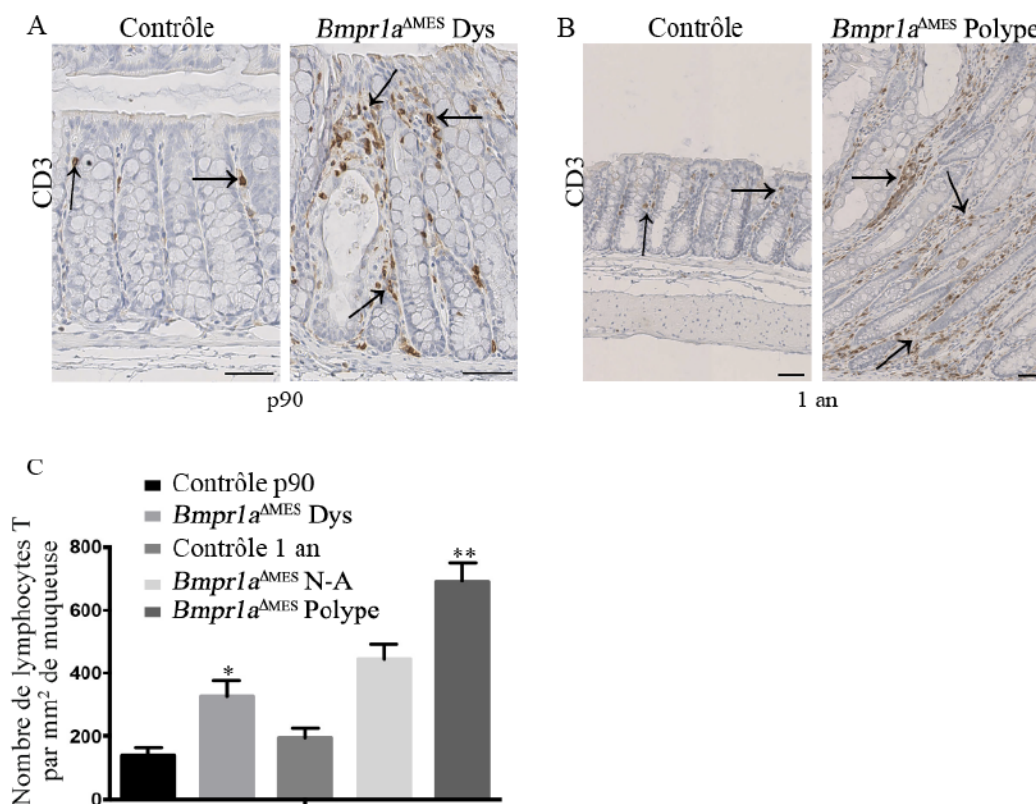


Figure 35. Localisation de cellules immunitaires de type lymphocyte T.

(A) Une immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la protéine CD3 démontre la présence normale de quelques lymphocytes T (flèches noires) au niveau de la muqueuse des souris contrôles âgées de 90 jours. Les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent une infiltration des cellules positives pour CD3, principalement au niveau du mésenchyme. (B) L'anticorps dirigé spécifiquement contre CD3, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an, démontre l'accumulation des lymphocytes T dans le mésenchyme des polypes comparativement à leur présence limitée dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50µm. (C) Le compte des cellules marquées pour CD3 démontre une infiltration significative des lymphocytes T dans les régions dysplasiques et les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *p < 0.05 et **p < 0.01 selon le test ANOVA à 2 voies, n=6 souris. Dys = régions dysplasiques, N-A = régions non-affectées.

Finalement, les lymphocytes B ont été analysés sur les mêmes types de coupes histologiques mais en utilisant la technique d'immunofluorescence dirigée contre le récepteur CD45R retrouvé à la surface des cellules B. Ces lymphocytes B sont retrouvés en nombre restreint dans la muqueuse des souris contrôles et les régions non-affectées des

souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. On remarque une légère augmentation du nombre de lymphocytes B retrouvés dans les régions dysplasiques des souris expérimentales de 90 jours (Figure 36A). Cette augmentation significative est confirmée par les analyses statistiques du nombre de cellules CD45R positives dans les régions affectées et les régions non-affectées des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} et dans les souris contrôles (Figure 36C). De plus, on observe les mêmes caractéristiques chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an comparativement aux souris contrôles du même âge (Figure 36B). Ces résultats confirment les analyses effectuées par la vétérinaire pathologiste, Dr Marilène Paquet, qui conclue que les régions affectées par la perte de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes possèdent une infiltration de cellules immunitaires. De plus, on peut dire que cette infiltration est caractérisée par une présence accrue de lymphocyte T, suivie des cellules myéloïdes, les neutrophiles et macrophages, mais aussi par une légère augmentation dans le nombre de lymphocytes B. Finalement, l'infiltration de cellules immunitaires est présente de façon plus modérée dans les stades précoces de notre phénotype et s'aggrave intensément avec le vieillissement des souris.

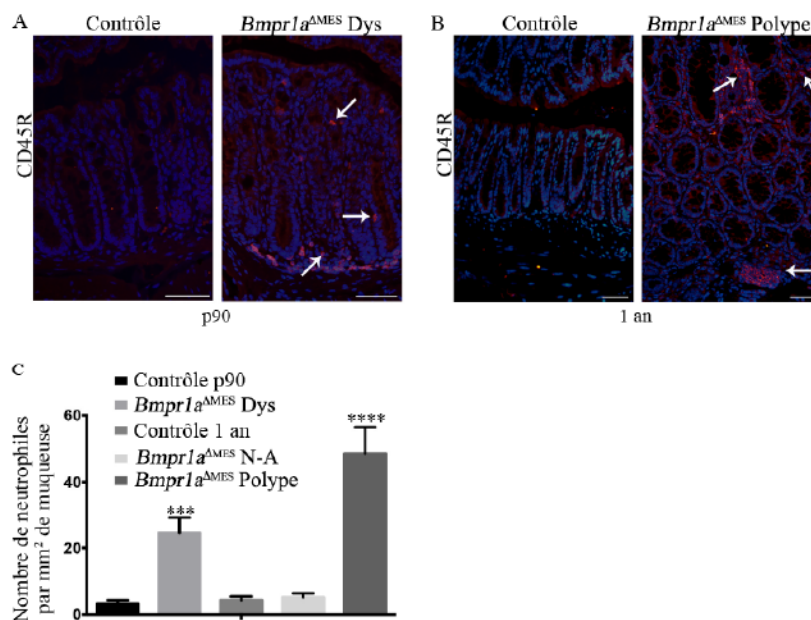


Figure 36. Localisation de cellules immunitaires de types lymphocytes B.

(A) Une immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre la protéine CD45R, dans les souris âgées de 90 jours, démontre la présence de quelques lymphocytes B (flèches blanches), sous les cellules épithéliales de surfaces et dans le fond des cryptes, des régions dysplasiques des *Bmpr1a*^{ΔMES} contrairement aux contrôles qui ne démontrent aucune cellule B dans leur muqueuse. (B) L'anticorps dirigé spécifiquement contre CD45R, dans le côlon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔMES} âgées de 1 an, démontre l'accumulation des lymphocytes B dans le mésenchyme des polypes comparativement à leur absence dans les souris contrôles. Les barres d'échelles représentent 50μm. (C) Le compte des cellules marquées pour CD45R démontre une infiltration significative des lymphocytes T dans les régions dysplasiques et les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, ***p < 0.001 et ****p < 0.0001 selon le test ANOVA à 2 voies, n= 6 souris. Dys = régions dysplasiques, N-A = régions non-affectées.

3.2.9 La perte de *Bmpr1a* mésenchymateuse entraine une dérégulation du microenvironnement.

Les myofibroblastes sont intimement liés à la production d'un mésenchyme réactif et des modifications du microenvironnement subséquentes via la production de facteurs de croissance, cytokines et chimiokines. Ces modulations vont directement affecter les fonctions des cellules mésenchymateuses et tumorales ainsi que les voies de signalisation pro ou anti-tumorales (Polanska et Orimo, 2013). Afin de déterminer les modifications qui pourraient être responsables du changement de microenvironnement, des analyses en qPCR ont été effectuées sur différents extraits. Tout d'abord, l'ARNm a été extrait du côlon

moyen des souris âgées de 3 mois, contrôles et expérimentales. Plusieurs facteurs solubles appartenant à différentes familles, que ce soit la superfamille du TGF β , la signalisation des Wnt, les cytokines/chimiokines et les facteurs produits par les myofibroblastes, ont été analysés sur ces différents extraits. Les résultats obtenus pour les différentes analyses sont présentés dans le tableau 8 et ne démontrent aucune modification significative dans la plupart des gènes exceptés pour la *R-Spondine1*. Afin de vérifier si la modulation de certaines de ces gènes corrélaient avec la polypose, l'ARNm a été extrait directement des polypes isolés pour les comparer aux extraits des marges non-affectées et des souris contrôles du même âge. Plusieurs modulations significatives, présentées dans le tableau 8, sont observées dans les polypes et ce pour la plupart des familles de gènes analysés. En effet, les ligands Bmp4 et Bmp7 ainsi que l'antagoniste Gremlin sont augmentés tandis que le ligand Bmp2 et l'antagoniste Noggin sont diminués comparativement aux souris contrôles. Le ratio total des modulations des ligands et des inhibiteurs démontre une grande dérégulation de la voie de signalisation des Bmps. Toutefois, les immunofluorescences utilisant un anticorps dirigé contre phosphoSmad1-5-8 précédemment présentées (Figure 22, 28) démontrent qu'il ne semble pas y avoir de modulation soutenue de son état d'activation ou d'inhibition dans l'épithélium principalement. La voie des Wnt est aussi dérégulée dans les souris plus âgées puisque le ligand Wnt5a est grandement augmenté comme les inhibiteurs sFRP1 et Dkk3, tandis que le gène de la *R-Spond1* connu pour activer cette voie est diminué dans ces mêmes conditions. On observe une forte augmentation de certaines cytokines et chimiokines, (Il1 β , Cxcl1, Il6, Cxcl12, Ccl8, Ccl2) qui sont connues pour être sécrétées par les myofibroblastes activés dans un état pathologique (De Boeck *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2013). Finalement, d'autres facteurs produits et sécrétés principalement par les myofibroblastes sont grandement à la hausse comme la ténascine (Tnc), la fibronectine, le Hgf, l'épimorphine (Épim) et la thrombospondine-1 (Thbs1) ainsi que des marqueurs des myofibroblastes activés soit PdgfR- β , Cxcr4 et Cxcl12.

Tableau 10. Niveau d'expression des facteurs solubles et non-solubles associés à la composition du microenvironnement des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

| Gènes | Changement à 90 jours (côlon total) | P Value | Changement à 1 an (polypes) | P Value |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------|-----------------------------|----------|
| Signalisation du TGFβ / Bmp | | | | |
| <i>Bmp2</i> | -1.2 | ns | -2.13 | 0.015 |
| <i>Bmp4</i> | 1.48 | ns | 4.79 | 0.0004 |
| <i>Bmp7</i> | 2.7 | ns | 7.66 | < 0.0001 |
| <i>Chordin</i> | 1.38 | ns | 2.615 | 0.0003 |
| <i>Gremlin</i> | 1.46 | ns | 5 | < 0.0001 |
| <i>Noggin</i> | -1.15 | ns | -1.89 | 0.0077 |
| <i>Follistatin</i> | -1.05 | ns | 1.935 | ns |
| <i>Tgfβ1</i> | -1.1 | ns | 2.35 | 0.0408 |
| Cytokine / Chémiokine | | | | |
| <i>Il1β</i> | 3.33 | ns | 35.85 | 0.0109 |
| <i>Il6</i> | 2.5 | ns | 15.39 | < 0.0001 |
| <i>Cxcl1</i> | 1.95 | ns | 9.4 | 0.0005 |
| <i>Cxcl12</i> | 0.93 | ns | 5.2 | 0.0152 |
| <i>Cxcr4</i> | 0.79 | ns | 14.41 | 0.0045 |
| <i>Ccl2</i> | 1.01 | ns | 18.75 | 0.0007 |
| <i>Ccl8</i> | 6.5 | ns | 14.5 | 0.0115 |
| <i>Ccl11</i> | 1.34 | ns | 2.245 | ns |
| Signalisation des Wnt | | | | |
| <i>Wnt5a</i> | 1.02 | ns | 6.55 | 0.001 |
| <i>Dkk3</i> | 0.93 | ns | 1.92 | 0.006 |
| <i>sFrp1</i> | 0.05 | ns | 2.83 | 0.0015 |
| <i>RSpnd1</i> | -1.82 | 0.0032 | -1.33 | ns |
| Facteurs des myofibroblastes | | | | |
| <i>Tnc</i> | 1.5 | ns | 5.83 | 0.014 |
| <i>Epim</i> | -1.43 | ns | 2.22 | 0.0036 |
| <i>Fn1</i> | 1.16 | ns | 4.00 | 0.0018 |
| <i>Pdgfa</i> | 1.18 | ns | 1.08 | ns |
| <i>Pdgfr-β</i> | 2.04 | ns | 4.323 | 0.0066 |
| <i>Thbs1</i> | 1.433 | ns | 5.71 | 0.0049 |
| <i>Hgf</i> | 2.2 | ns | 11.24 | 0.0006 |

Les changements représentent le ratio des valeurs d'expression moyennes (contrôles/*Bmpr1a*^{ΔMES}) des gènes analysés par qPCR. Les valeurs négatives indiquent une réduction chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. NS, changement non-significatif (Student's *t* test), n= 6 souris.

En résumé, le modèle murin possédant la délétion spécifique de *Bmpr1a* dans les cellules du mésenchyme, principalement les myofibroblastes, a permis de démontrer des rôles encore insoupçonnés de cette signalisation dans l'homéostasie du côlon. Les

expériences effectuées sur ce modèle ont établis que la signalisation des Bmps, dans les myofibroblastes, était responsable de l'homéostasie de ce type cellulaire. Cette signalisation semble leur conférer une capacité à réguler la production des éléments de la matrice extracellulaire et la sécrétion des facteurs de croissance et des cytokines. Les myofibroblastes invalidés pour *Bmpr1a* sont intimement liés au développement du mésenchyme réactif via la production de certains facteurs solubles et non-solubles. Ces facteurs vont influencer la composition du microenvironnement et les fonctions cellulaires normales ainsi qu'influencer des signalisations pro-oncogéniques comme celles du TGF β , des Bmps et des Wnt (Polanska et Orimo, 2013). Comme pour les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, lorsqu'on a une mutation de *Bmpr1a* menant à l'inhibition de la voie de signalisation des Bmps dans le mésenchyme, les dérégulations engendrées au niveau du microenvironnement vont entraîner des modifications de l'homéostasie des cellules épithéliales. En somme, ces dérégulations vont favoriser le développement de dysplasie et l'initiation de la polypose. Les études effectuées dans ce volet démontrent des évidences claires de l'importance de la signalisation des Bmps mésenchymateuse dans un modèle de polypose s'apparentant au syndrome de polypose juvénile (JPS) (Brosens *et al.*, 2011).

3.3 Volet 3 : La signalisation myofibroblastique des Bmps régule des éléments importants du microenvironnement.

3.3.1 Validation de l'efficacité des shBmpr1a dans les 18Co.

Étant donné que, dans le modèle murin *Bmpr1a*^{ΔMES}, la population de cellules visées par la délétion représente une infime proportion des cellules de la muqueuse, il est très laborieux de déterminer le mécanisme associé aux phénotypes de ces souris. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé un modèle cellulaire *in vitro* nous permettant d'aborder la mécanistique plus directement. Une lignée cellulaire de myofibroblastes de

côlon humain, les CCD-18Co, a été utilisée dans laquelle la signalisation des Bmps fut inhibée par l'utilisation de shARN dirigés contre *Bmpr1a* (18Co^{shBmpr1a}) et des shnon-ciblants comme contrôle (18Co^{shnon-ciblants}) (Valentich *et al.*, 1997). Les shARN furent introduits dans les 18Co grâce à des infections de lentivirus contenant les constructions nécessaires à la réplication des shARNs. La plupart des expériences, tell celle de la validation des shARNs utilisés, furent effectuées 72 heures après l'infection. De plus, les infections avec les shARNs ont été effectuées à trois reprises indépendantes afin d'avoir des résultats en triplicatas. La validation du sh*Bmpr1a* fut effectuée par analyse en immunobuvardage utilisant un anticorps spécifique contre phosphoSmad1-5-8. Ainsi, on peut valider l'inactivation de la voie de signalisation des Bmps par le sh*Bmpr1a*. Les 18Co infectés avec les sh*Bmpr1a* démontrent une perte presque totale de la signalisation des Bmps, comparativement aux conditions contrôles (non-infectés, TurboGFP, shnon-ciblants) (Figure 37A). De plus, des niveaux constants de l'effecteur Smad1 dans chacun des puits démontrent que la perte de phosphorylation est caractéristique de l'inhibition de la voie. L'immunobuvardage contre phosphoSmad3 démontre qu'il n'y a pas de modulation de la signalisation du TGF- β induite par le sh*BMPR1A*. Les analyses densitométriques des différents immunobuvardages ont démontré l'inhibition significative de la signalisation des Bmps uniquement, sans modification des voies connexes, dans les 18Co^{shBmpr1a}. (Figure 37B).

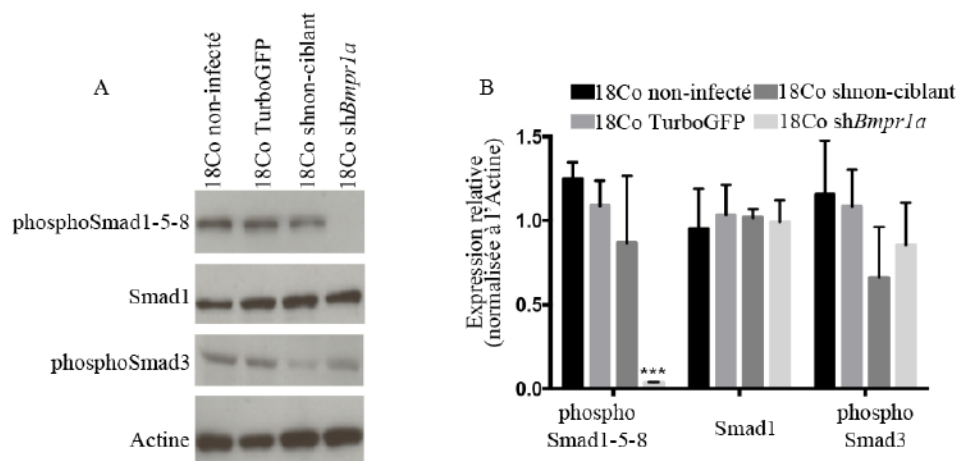


Figure 37. Validation de la lignée cellulaire 18Co^{shBmpr1a}.

Des infections avec des lentivirus possédant différents shARN ont été effectuées dans les 18Co pendant 72heures. (A) Les immunobuvardages ont été réalisés sur les extraits

protéiques des 4 conditions de 18Co (non-infectés, TurboGFP, shnon-ciblante, shBmpr1a). L'expression protéique de phosphoSmad1-5-8, Smad1, phosphoSmad3 et de l'actine ont été déterminées par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chacune des protéines. L'image représente une expérience représentative des triplicatas d'infections différentes (B). L'expression relative de ces protéines a été déterminée par densitométrie, en utilisant le logiciel ImageJ. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, ***p < 0.001 selon le test T de Student, n=3 expériences.

3.3.2 Validation du traitement au LDN193189 sur les 18Co.

Afin de donner plus de poids aux expériences *in vitro*, un deuxième modèle d'inhibition de la signalisation des Bmps fut utilisé. Il s'agit d'un traitement au LDN193189, un antagoniste spécifique du récepteur Bmpr1a, permettant d'inhiber de façon spécifique la même voie de signalisation que celle du modèle murin. Le LDN est appliqué sur les 18Co à une concentration de 1µM et ce pendant une période de 6 heures, après quoi on observait une toxicité chez les cellules. Après ce 6 heures de traitement, les différentes expériences étaient effectuées. De plus, les traitements au LDN193189 ont été effectués à trois reprises indépendantes afin d'avoir des résultats en triplicatas. L'efficacité du traitement fut validée par analyse en immunobuvardage et comparée au 18Co^{shBmpr1a} afin de démontrer une inhibition similaire de la signalisation intracellulaire des Bmps. L'utilisation du même anticorps spécifique à phospho-Smad1-5-8 assure la visualisation de l'activation de la voie. Les 18Co traitées au LDN (18Co^{LDN193189}) démontrent une perte totale de l'activation de la signalisation des Bmps, comparativement aux 18Co non-traités (18Co^{DMSO}), l'image représente une expérience représentative des triplicatas (Figure 38A). De plus, l'inactivation de la signalisation des Bmps entre les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189}, par rapport à leur contrôle respectif, est très comparable entre les deux expériences, démontrant la validité d'utiliser ces deux modèles d'étude pour regarder le rôle spécifique de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes. Les analyses densitométriques des immunobuvardages révèlent l'inhibition significative de cette signalisation dans les 18Co^{LDN193189} (Figure 38B).

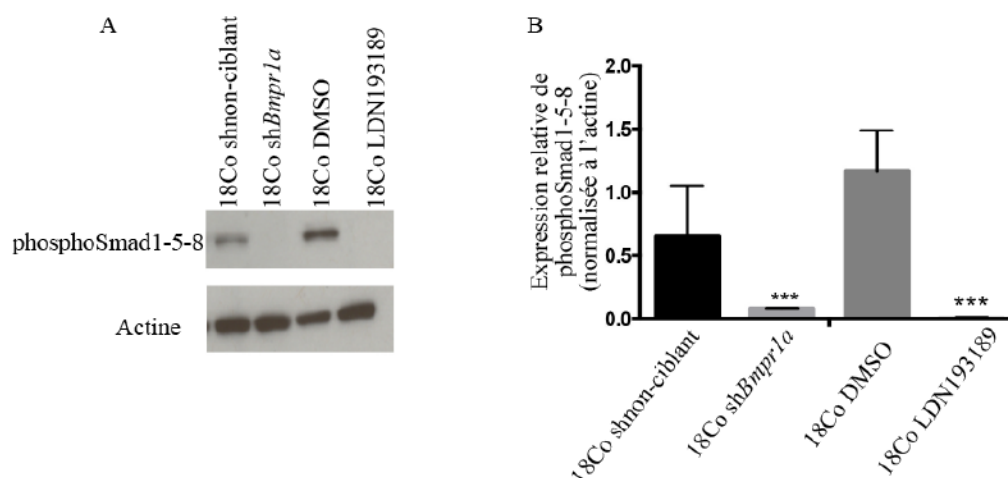


Figure 38. Validation du traitement au LDN193189 1uM sur les 18Co.

Des traitements avec le LDN193189 ou le DMSO ont été effectués dans les 18Co, pendant 6 heures. (A) Les immunobuvardages ont été réalisés sur les extraits protéiques des 4 conditions de 18Co (shnon-ciblant, shBmpr1a, DMSO, LDN193189). L'expression protéique de phosphoSmad1-5-8 et de l'actine ont été déterminées par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chacune des protéines. L'image représente une expérience représentative des triplicatas de traitements au LDN193189. (B) L'expression relative de ces protéines a été déterminée par densitométrie, en utilisant le logiciel ImageJ. Le graphique représente les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la SEM, *** $p < 0.001$ selon le test T de Student, $n=3$ expériences.

3.3.3 Analyse en micropuce d'ADN du profil transcriptionnel des 18Co.

L'intérêt principal de cette étude est de déterminer le profil transcriptionnel des 18Co inhibés pour la signalisation des Bmps afin de trouver le mécanisme qui pourrait être associée au phénotype du modèle murin. Pour avoir un profil transcriptionnel, une micropuce d'ADN a été effectuée à partir d'extraits d'ARNs des différentes conditions de 18Co (shnon-ciblant, shBmpr1a, DMSO, LDN193189). La micropuce utilisée fut la Illumina HumanHT-12 v4.0 sollicitant 47 000 sondes permettant d'analyser l'expression de près de 25 000 gènes simultanément. Les infections avec les shARN ainsi que les traitements au LDN193189 ont été effectuées à trois reprises indépendantes afin d'avoir des triplicatas d'ARN pour chacune des expériences. Le logiciel MicroFlex Array le traitement de la banque de données obtenue à partir la micropuce d'ADN pour générer des listes de gènes modulés. Par la suite, l'utilisation du logiciel Ingenuity Analysis Pathway IPA permet le traitement de cette liste en fonction des données déjà connues dans la littérature à

propos de milliers de molécules. En interrogeant IPA, les premières observations recueillies furent la comparaison de différentes conditions d'inhibition des Bmps. Les cellules 18Co ayant la signalisation des Bmp inhibée par les shARNs possèdent un plus grand nombre de gènes modulés que les 18Co traités au LDN. De plus, 40 gènes se retrouvent à être modulés similairement de façon significative dans les deux conditions (Figure 39). Pour la suite des analyses, une liste de gènes combinant les modulations des 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} a été générée afin de regarder des fonctions et des voies de signalisation associées spécifiquement à la délétion des Bmps.

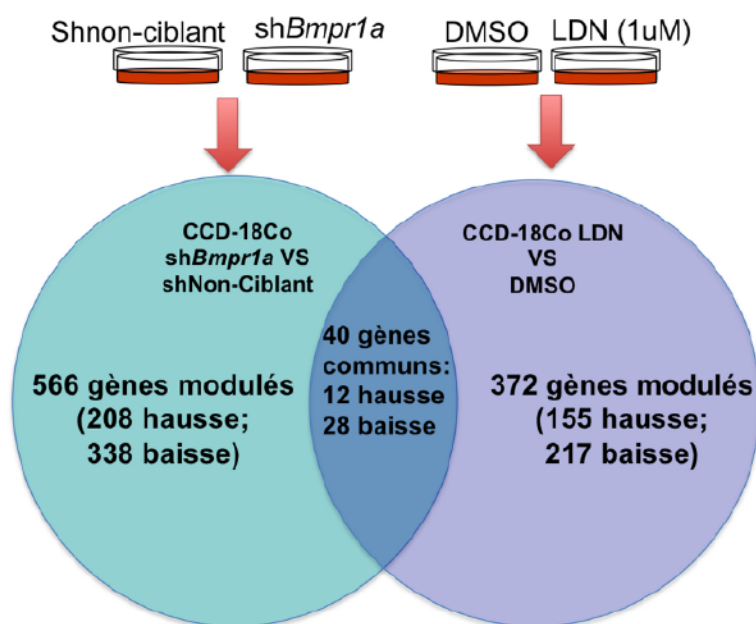


Figure 39. Diagramme de Venn représentant le profil transcriptionnel des 18Co^{shBmpr1a} vs 18Co^{LDN193189}.

Des triplicatas des différentes conditions (18Co^{shnon-ciblant}, 18Co^{shBmpr1a}, 18Co^{DMSO}, 18Co^{LDN193189}) ont été analysés sur une micropuce Illumina HumanHT-12 v4.0. Le diagramme de Venn représente le profil transcriptionnel général obtenu après l'analyse de l'expression relative des gènes. Le cercle de gauche représente les 18Co^{shBmpr1a} vs les 18Co^{shnon-ciblant} et le nombre de gènes modulés à la hausse et à la baisse. Le cercle de droite représente les 18Co^{LDN193189} vs 18Co^{DMSO} ainsi que le nombre de gènes avec des modulations significatives à la hausse et à la baisse. L'espace d'entrecroisement des cercles représente les gènes communs aux 18Co^{shBmpr1a} vs 18Co^{LDN193189}. L'expression relative de ces ARN a été déterminée par l'analyse des données Illumina avec le logiciel FlexArray. Les limites de significativité ont été placées à un changement de ratio d'expression de ± 1.5 et une valeur de test significatif de $p < 0.05$ n=3 expériences.

L'utilisation du logiciel IPA permet de classer les gènes modulés et de calculer l'impact que pourrait avoir ces modulations sur des maladies et des fonctions biologiques spécifiques dépendamment du profil transcriptionnel associé. Cette fonction permet de calculer un z-Score démontrant de l'état prédit d'activation (> -1) ou d'inhibition (> 1) de cette fonction. De façons générales, différentes fonctions associées aux cellules sanguines, dont l'activation des leucocytes, des lymphocytes et la quantité de cellules sanguines, sont dans un état prédit d'activation avec un grand nombre de molécules modulées provenant du profil transcriptionnel des 18Co. De plus, la fibrose, une maladie et/ou état pathologique possédant souvent une sur-activation des myofibroblastes, est aussi prédite à être activée selon ce même profil transcriptionnel. À l'opposé, les maladies du tractus gastro-intestinal ainsi que le cancer colorectal ou gastrique sont prédits à être inhibé selon l'arrêt de la signalisation des Bmps dans les 18Co. De plus, différentes fonctions associées aux cellules tumorales, comme la prolifération et la progression du cycle cellulaire sont aussi prédites à être inhibées avec un grand nombre de molécules qui se retrouvent modulées dans ce profil transcriptionnel.

Tableau 11. Liste des maladies et fonctions prédites à être modulées

| Maladie et fonctions | État prédit | Z-Score | # de molécules |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| Activation des cellules du sang | Activation | 2,738 | 52 |
| Activation des leucocytes | Activation | 2,433 | 46 |
| Activation des lymphocytes | Activation | 3,162 | 30 |
| Activation des lymphocytes T | Activation | 2,601 | 26 |
| Cancer du tractus GI (haut) | Inhibition | -1,963 | 39 |
| Cancer Gastro-intestinal | Inhibition | -1,961 | 39 |
| Fibrose | Activation | 2,831 | 39 |
| Maladies Gastro-intestinales | Inhibition | -1,961 | 39 |
| Organisation du cytosquelette | Inhibition | -2,464 | 89 |
| Progression du cycle cellulaire | Inhibition | -2,465 | 87 |
| Prolifération des cellules tumorales | Inhibition | -3,500 | 124 |
| Quantité des cellules du sang | Activation | 2,469 | 63 |

Le logiciel IPA permet de faire ressortir différentes voies de signalisation possédant des modulations marquantes dans les conditions utilisées. Une première grande famille de voie de signalisation modulée est celle de la superfamille du TGF β . La validation de conditions d'inhibition de la signalisation des Bmps est bien validée par la diminution de la majorité des gènes cibles connues appartenant à la signalisation des Bmps. En effet, les différents ID (*ID1* à *ID3*) ainsi que les Smad inhibiteurs (*iSmad6* et *iSmad7*) sont modulés à la baisse de façon significative dans les deux conditions. De plus, le nouveau gène cible *ATOH8* est aussi diminué et renforce la validation de l'inhibition des Bmps dans les 18Co. D'autres antagonistes extracellulaires de la superfamille du TGF β sont modulés à la baisse, comme c'est le cas pour la *FOLLISTATINE* (*FST*), *GREMLIN* (*GREM1*) et *NOGGIN*. Au niveau de la signalisation du TGF β , on retrouve une augmentation du récepteur de type II (*TGFBR2*) et de son ligand *TGF β 3*.

Tableau 12. Liste des gènes modulés appartenant à la superfamille du TGF β .

| Nom du gène | Expression relative | Valeur de <i>P</i> |
|----------------|---------------------|--------------------|
| <i>ATOH8</i> | -4,049 | 1,67E-05 |
| <i>BMP4</i> | 2,195 | 3,73E-05 |
| <i>BMPRI1A</i> | -2,346 | 1,66E-12 |
| <i>FST</i> | -1,782 | 1,42E-06 |
| <i>GREM1</i> | -2,595 | 1,05E-03 |
| <i>ID1</i> | -14,274 | 7,84E-11 |
| <i>ID2</i> | -4,353 | 1,03E-09 |
| <i>ID3</i> | -11,895 | 4,92E-10 |
| <i>iSMAD6</i> | -2,335 | 6,89E-05 |
| <i>iSMAD7</i> | -2,131 | 3,78E-07 |
| <i>LTBP4</i> | -1,463 | 2,44E-03 |
| <i>NOGGIN</i> | -1,293 | 2,41E-02 |
| <i>TGFB3</i> | 2,240 | 7,45E-06 |
| <i>TGFBR2</i> | 2,187 | 1,50E-08 |

Les myofibroblastes sont d'importants sécréteurs de facteurs de croissance ayant une influence sur les différentes cellules avoisinantes. Les 18Co en culture possèdent toujours cette capacité de sécrétion de facteurs de croissance importants dans l'homéostasie intestinale. Dans le cas de l'inhibition de la signalisation des Bmps, la capacité des 18Co à sécréter des facteurs de croissances semble être modulée de différentes façons puisqu'on observe une plus grande production des ARNm de HGF, de IGFR1 et de PDGFC. Toutefois, les facteurs FGF, soit : FGF2, FGFR3, FGFR4 et FGFR1, sont diminués comparativement aux 18Co non-traités.

Tableau 13. Liste des gènes modulés associés aux facteurs de croissance

| Nom du gène | Expression relative | Valeur de <i>P</i> |
|--------------|---------------------|--------------------|
| <i>EGFR</i> | 1,266 | 2,14E-01 |
| <i>FGF2</i> | -1,302 | 3,05E-01 |
| <i>FGFR3</i> | -2,646 | 1,98E-11 |
| <i>FGFR4</i> | -2,502 | 7,43E-06 |
| <i>FGFR1</i> | -2,580 | 5,98E-04 |
| <i>HGF</i> | 1,951 | 3,09E-03 |
| <i>IGFR1</i> | 2,259 | 1,05E-01 |
| <i>PDGFC</i> | 2,120 | 8,76E-03 |
| <i>VEGF</i> | -1,479 | 4,93E-03 |

La fibrose est une des maladies prédites par le logiciel IPA pour être activés dans les conditions d'inhibition des Bmps. Ce logiciel a de ce fait identifié des éléments de la matrice extracellulaire modulés significativement à la hausse dans ces conditions. Plusieurs membres des collagènes (COL4A5, COL5A3, COL7A1, COL11A1) possèdent une expression relative supérieure à deux comparativement aux 18Co contrôles. La FIBRONECTINE et le protéoglycan CSPG4 sont d'importants éléments faisant partie de la composition de la matrice extracellulaire. Ces deux molécules sont augmentées significativement suite à l'inhibition des Bmps contrairement à l'expression de la TENASCINE C (TNC) et de la TRHOMBOSPONDINE-2 (THBS2) qui sont diminuées dans les mêmes conditions.

Tableau 14. Liste de gènes modulés associés à la composition de la matrice extracellulaire

| Nom du gène | Expression relative | Valeur de <i>P</i> |
|--------------------|---------------------|--------------------|
| <i>COL1A1</i> | 1,562 | 5,65E-04 |
| <i>COL4A5</i> | 3,439 | 1,40E-08 |
| <i>COL5A3</i> | 2,259 | 5,52E-05 |
| <i>COL7A1</i> | 2,390 | 1,12E-07 |
| <i>COL11A1</i> | 2,092 | 8,33E-07 |
| <i>CSPG4 / NG2</i> | 1,641 | 2,55E-05 |
| <i>FN1</i> | 1,959 | 3,53E-02 |
| <i>THBS2</i> | -2,071 | 3,71E-03 |
| <i>TNC</i> | -1,885 | 1,59E-02 |

De façon similaire, plusieurs fonctions associées aux cellules sanguines étaient prédites par le logiciel pour être activées dans des conditions d'inhibition des Bmps. IPA a permis de mettre en perspective certaines signalisations de cytokines ou chimiokines qui pourraient être modulées significativement dans notre modèle. Plusieurs membres des chimiokines (CCL7, CCL8, CCL11, CCL13) possèdent une expression relative supérieure à deux comparativement aux 18Co contrôles. La cytokine IL1 β , une molécule importante pour sa grande diversité de réponses chez plusieurs types cellulaires est la seule cytokine qui se révèle augmentée significativement suite à l'inhibition des Bmps. Au niveau des myofibroblastes ayant subi l'arrêt de signalisation des Bmps, ce sont les récepteurs, IL1R, IL6R et IL7R qui sont augmentés de façon significative au niveau de leur ARNm comparativement aux interleukines elles-mêmes.

Tableau 15. Liste des gènes modulés associés aux cytokines et chimiokines

| Nom du gène | Expression relative | Valeur de <i>P</i> |
|-------------|---------------------|--------------------|
| <i>CCL2</i> | 1,505 | 5,30E-07 |
| <i>CCL7</i> | 2,001 | 6,04E-05 |
| <i>CCL8</i> | 3,936 | 5,30E-07 |

| | | |
|------------------------------|-------|----------|
| <i>CCL11</i> | 2,419 | 5,04E-05 |
| <i>CCL13</i> | 2,159 | 3,73E-05 |
| <i>CXCR4</i> | 3,114 | 2,23E-10 |
| <i>IL1β</i> | 1,470 | 5,98E-03 |
| <i>IL1R</i> | 2,385 | 4,34E-05 |
| <i>IL6R</i> | 1,735 | 1,35E-03 |
| <i>IL7R</i> | 3,055 | 9,71E-06 |

L'inhibition des Bmps, que ce soit via un traitement pharmacologique par le LDN193189 ou via les shARN ciblant le récepteur *Bmpr1a*, engendre des effets critiques sur le myofibroblaste et modifie son profil transcriptionnel. Cette analyse des ARN permet d'avoir une vue d'ensemble des modulations sous-jacentes à l'inhibition des Bmps dans ces cellules et est primordiale à l'identification d'un mécanisme expliquant le phénotype obtenu dans le modèle murin décrit plus haut.

4. DISCUSSION

4.1 Volet 1 : *Smad5 et la régulation de la barrière intestinale et l'inflammation*

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des maladies multifactorielles qui affectent énormément la qualité de vie des patients et qui augmentent les risques de développer le cancer colorectal (Westbrook *et al.*, 2010). Il est donc essentiel d'essayer de mieux comprendre les mécanismes d'action pouvant mener à cette inflammation chronique afin de trouver de meilleures thérapies potentielles. La superfamille du TGF- β est bien reconnue pour son implication dans la pathogenèse des maladies inflammatoires intestinales, puisque cette signalisation permet de bloquer la réponse inflammatoire et stimuler la réparation de l'épithélium (Beck *et al.*, 2003; Monteleone, Giovanni *et al.*, 2001). Depuis quelques années, il y a un intérêt grandissant pour la signalisation des Bmps, un membre de la superfamille du TGF- β , au niveau de l'intestin. Les Bmps sont encore peu étudiés dans le cadre des maladies inflammatoires intestinales. Une étude suggère que l'injection du ligand Bmp7 au niveau du côlon permettrait une réparation accélérée de la muqueuse colique dans le cadre d'une colite chimique induite chez le rat (Maric *et al.*, 2003). Les études impliquant ce morphogène au niveau du tractus gastrointestinal se sont principalement concentrées à démontrer les rôles de cette signalisation très importante au niveau de la morphogenèse, de la différenciation et de l'homéostasie de l'intestin (Auclair *et al.*, 2007; Haramis *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004). Les différences et la spécificité d'action des trois effecteurs de la signalisation des Bmps, Smad1, Smad5 et Smad8, peuvent expliquer la biodiversité des réponses biologiques associées aux Bmps. Effectivement, les études développementales démontrent des rôles distincts de ces effecteurs dans l'embryogenèse et suggèrent un rôle spécifique pour Smad5 dans le développement de l'intestin (Chang, H. *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2001).

4.1.1 *Smad5 et le contrôle de la prolifération et la migration des cellules épithéliales*

Dans le cadre de cette étude, les rôles spécifiques de Smad5 au niveau des cellules épithéliales et de l'homéostasie intestinale ont été investigués. Les souris *Smad5*^{ACEI} et leurs contrôles ont été utilisées afin de vérifier l'implication de cet effecteur dans la signalisation

des Bmps dans l'architecture et l'homéostasie intestinale et colique (Allaire *et al.*, 2011). Les études antérieures de l'équipe de la professeure Perreault ainsi que celles d'autres équipes ont démontré que la signalisation épithéliale des Bmps est caractérisée par une augmentation de la longueur des cryptes et des villosités associées avec un plus grand nombre de cellules prolifératives (Auclair *et al.*, 2007; Haramis *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004). Les résultats de cette étude démontrent que les souris *Smad5*^{ΔCEI} possèdent une augmentation de la longueur des villosités de l'intestin sans avoir de modification des cryptes sous-jacentes ou des glandes coliques. La prolifération n'étant pas modulée suite à la délétion de *Smad5*, elle ne peut pas expliquer l'allongement des villosités retrouvés chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}. Outre la prolifération cellulaire, une augmentation de la vitesse de migration ou une diminution de l'apoptose des cellules épithéliales à l'apex des villosités sont aussi des processus qui peuvent expliquer un tel allongement villositaire. Toutefois, la perte de *Smad5* amène une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales. Ces résultats ne récapitulent pas le phénotype obtenu chez la souris possédant la délétion épithéliale du récepteur *Bmpr1a*, où les deux processus cellulaires, la prolifération et la migration, étaient modulés (Auclair *et al.*, 2007). Dans ce modèle de souris, il est à noter que l'activité des trois BR-Smads (*Smad1*, *Smad5*, *Smad8*) était affectée par la délétion du récepteur *Bmpr1a*. Cette disparité entre les souris *Smad5*^{ΔCEI} et les souris *Bmpr1a*^{ΔCEI} démontrent que l'effecteur *Smad5* n'est pas responsable de tous les effets de la signalisation des Bmps et que cet effecteur contrôle de façon spécifique la migration des cellules épithéliales et non leur prolifération.

Afin de pouvoir confirmer que les résultats obtenus avec les souris *Smad5*^{ΔCEI} étaient bien dus à la délétion spécifique de *Smad5*, l'expression en ARNm de tous les effecteurs des Bmps, *Smad1*, *Smad5* et *Smad8*, a été analysée. Tout d'abord, la perte d'expression de *Smad5* dans l'épithélium a été confirmée par la perte à 97% de son ARNm dans des extraits enrichis de cellules épithéliales. De plus, les autres effecteurs de la voie, *Smad1* et *Smad8*, qui peuvent compenser pour la perte de *Smad5* ne démontrent aucune modulation significative de leurs niveaux d'ARNm. Il est donc démontré qu'aucune compensation par les autres effecteurs de la voie n'est présente dans les souris *Smad5*^{ΔCEI}. De plus, l'expression résiduelle de 3% pourrait être attribuable à la présence de

lymphocytes intra-épithéliaux dans nos extraits d'enrichissement. Effectivement, la technique de MatriSparse permet de dissocier l'épithélium du mésenchyme de la même façon qu'on enlève un gant de notre main et d'enrichir la fraction épithéliale (Perreault et Beaulieu, 1998). Ainsi il est difficile d'éliminer complètement les lymphocytes intra-épithéliaux qui s'insèrent entre les cellules épithéliales (Ogata *et al.*, 2014). La signalisation des Bmps est présente au niveau des cellules immunitaires, ce qui peut expliquer pourquoi on remarque une faible expression de *Smad5* dans l'épithélium des souris *Smad5*^{ΔCEI} (McReynolds *et al.*, 2007). Ces évidences suggèrent donc que les autres effecteurs, *Smad1* et *Smad8*, pourraient être responsables de la régulation de la prolifération cellulaire qui est Bmp dépendante et elles démontrent que *Smad5* est un régulateur spécifique de la migration des cellules épithéliales.

4.1.2 *Smad5* et le contrôle des protéines de jonctions

L'allongement villositaire qui est observé chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} ne peut être associé à une augmentation des cellules prolifératives ni à une diminution de l'apoptose comme le démontre les résultats obtenus aux figures 7 et 9. L'augmentation de la longueur des villosités peut être expliquée par l'augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité sans différence au niveau du taux d'extrusion de ces cellules à l'apex des villosités. Des études ont été effectuées chez un modèle de souris qui sur-expriment un dominant négatif de la N-cadhérine afin de remplacer l'expression normale de la E-cadhérine au sein de l'épithélium intestinal (Hermiston et Gordon, 1995). Ces souris ayant l'expression de la N-cadhérine possèdent des axes cryptes-villosités plus longs, une vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales accélérée et des problèmes dans leur cytosquelette d'actine (Hermiston et Gordon, 1995). En effet, les jonctions serrées et adhérentes sont des structures dynamiques qui nécessitent un remodelage constant au niveau de divers processus biologiques impliqués dans les stades de l'embryogénèse jusqu'à l'adulte. Cette constante réorganisation est essentielle pour assurer la prolifération et la migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité (Meng et Takeichi, 2009). De plus, lorsque ce processus est dérégulé, cela entraîne de graves conséquences physiologiques au niveau de la barrière épithéliale, comme une inflammation résultante du contact avec les bactéries ou des pertes d'eau important pouvant causer des diarrées (Bruewer *et al.*, 2006; Odenwald et Turner, 2013). Ces études

sont en concordance avec les résultats obtenus pour les souris *Smad5*^{ΔCEI}, puisque nous observons une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales le long de la villosité qui est associée avec des problèmes d'internalisation ou de mauvaise localisation de la E-cadhérine. Le phénotype associé à la E-cadhérine et aux autres protéines de jonctions, suite à la perte de *Smad5*, nécessite de meilleures investigations afin de déterminer le mécanisme d'action. En effet, nos résultats suggèrent une internalisation de la E-cadhérine et de sa partenaire de jonction la β -caténine. Toutefois, aucune expérience n'a été effectuée afin de démontrer s'il s'agissait d'un problème de transport vers la membrane, de stabilité de la protéine ou bien d'endocytose des jonctions.

Les images de microscopie électronique ainsi que l'internalisation des protéines de jonctions adhérentes et la dérégulation de claudine suggèrent des problèmes importants au niveau de l'assemblage et du maintien du complexe apical de jonctions. Ce complexe est une structure dynamique qui comprend les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Ce complexe possède des rôles actifs au niveau de la polarisation et de la migration cellulaire ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (Gumbiner, 2005; Hermiston et Gordon, 1995; IvanovHunt, *et al.*, 2005; Turner, J R, 2000). De plus, sa constante réorganisation est impliquée dans le processus de migration des cellules épithéliales de l'intestin (Ivanov, Nusrat, *et al.*, 2005) En fait, le complexe apical de jonctions nécessite l'endocytose et l'internalisation des protéines de jonctions transmembranaires afin de détacher la cellule de sa voisine et de permettre la dépolarisation nécessaire au processus de migration. Durant ce processus, les jonctions adhérentes ainsi que les jonctions serrées nécessitent leur internalisation de façon coordonnée afin de permettre l'avancement des cellules tout en conservant l'étanchéité de la barrière. Il n'est pas surprenant de voir qu'en plus d'une internalisation des protéines de jonctions adhérentes, les souris *Smad5*^{ΔCEI} possèdent des dérégulations au niveau des claudines formant les jonctions serrées.

Il est à noter que plusieurs études précédentes ont démontré un lien entre les modulations du cytosquelette, la migration des cellules épithéliales et le désassemblage des protéines de jonctions (IvanovHunt, *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2004; Ivanov, Nusrat, *et al.*,

2005). Durant ces phénomènes, plusieurs protéines agissant sur le cytosquelette vont être appelées à venir moduler son état. C'est le cas de la protéine cofiline qui possède un rôle dans la dépolymérisation des filaments d'actine. La cofiline ne peut se lier à l'actine dans son état phosphorylé, alors que sa déphosphorylation permet de réactiver sa capacité à lier l'actine (Agnew *et al.*, 1995). La cofiline va promouvoir la dépolymérisation de l'actine, ce qui brise les points de contact intracellulaires et cause une internalisation de la E-cadhérine et des autres protéines de jonctions (Ivanov *et al.*, 2004). Nos résultats démontrent que les souris *Smad5^{ACEI}* présentent une diminution de la cofiline phosphorylée, démontrant une plus grande activation de cette protéine comme précédemment mentionné. En effet, la cofiline active (déphosphorylée) est impliquée dans une plus grande motilité cellulaire des cellules neuronales *in vitro*, mais aussi dans le désassemblage du complexe apical de jonctions des cellules épithéliales intestinales (Ghosh *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2004). Ainsi, l'augmentation de cofiline déphosphorylée peut expliquer entre autres l'augmentation de la migration de cellule épithéliale et l'internalisation de la E-cadhérine observées chez les souris *Smad5^{ACEI}*. Toutefois, les niveaux totaux basaux de la cofiline ne sont pas modulés chez les mêmes souris démontrant qu'il ne s'agit pas d'une régulation transcriptionnelle du gène par le facteur de transcription Smad5. Une étude chez le *Xenopus laevis* a démontré qu'un gradient de concentration de Bmp7 permet la réponse bidirectionnelle des croissances neuronales (Wen *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'activation soutenue (20-24h) de la voie des Bmps, par le Bmp7, permet effectivement de diminuer les niveaux de phosphorylation de la cofiline sans affecter ses niveaux basaux. Ce processus s'effectue via l'action de la phosphatase Slingshot (Watanabe *et al.*) et permet une réponse répulsive des croissances neuronales (Watanabe *et al.*, 2014). Ssh permet la déphosphorylation spécifique de la cofiline ce qui mène à sa réactivation, ainsi la cofiline est en mesure de stimuler la dépolymérisation des filaments d'actine (Kousaka *et al.*, 2008). De façon opposée, une courte activation (4-8h) de la voie des Bmps par le même ligand augmente les niveaux de phosphorylation de la cofiline par l'action de la kinase Lim (Limk) permettant une attraction de croissances neuronales (Wen *et al.*, 2007). La Limk, pour sa part, est une kinase qui phosphoryle spécifiquement la cofiline pour mener à son inactivation (Salvarezza *et al.*, 2009). Cette étude supporte l'idée que la signalisation des Bmps peut moduler l'action de la cofiline en jouant sur l'activité ou l'expression de ses

régulateurs, la Limk et Ssh, et ainsi avoir une influence sur le cytosquelette d'actine et la migration. En effet, il est bien connu que la phosphorylation de la cofiline est régulée par la Limk et sa déphosphorylation par la Ssh, faisant d'eux les principaux régulateurs de son activité (Huang *et al.*, 2006). Pour sa part, Smad5 est un facteur de transcription qui va moduler l'expression de gènes cibles et ne possède aucune activité phosphatase ou kinase (Massague *et al.*, 2005). Les souris *Smad5*^{ΔCEI} présentent des variations de l'état de phosphorylation de la cofiline sans aucune modulation de sa transcription, ce qui suggère que Smad5 pourrait jouer sur la transcription de ses régulateurs. Toutefois, l'action de Smad5 au niveau transcriptionnel sur la Limk ou Ssh nécessite d'être investigué spécifiquement afin de spécifier comment la signalisation des Bmps intestinale contrôle l'état de phosphorylation de la cofiline et ainsi influencer la migration et le complexe apical de jonctions.

Un autre rôle important du complexe apical de jonction est celui du maintien de la barrière intestinale qui est dépendante de l'expression et l'interaction des protéines de jonctions serrées (Anderson *et al.*, 2004; Hartsock et Nelson, 2008). En plus d'avoir des rôles sur les protéines des jonctions adhérentes, les souris *Smad5*^{ΔCEI} présentent des niveaux augmentés de claudine-2 et diminués pour la claudine-1, deux protéines formant les jonctions serrées. Ces résultats obtenus pour les jonctions serrées avec les implications de Smad5 retrouvées au niveau des jonctions adhérentes et de la migration suggèrent que l'effecteur Smad5 pourrait avoir un rôle important dans la régulation et le maintien de la perméabilité de la barrière épithéliale. En effet, les protéines des jonctions serrées, les claudines, sont les principales protéines régulant la perméabilité transcellulaire de la barrière épithéliale (Turner, J R, 2009). Cette perméabilité est grandement affectée par de simples changements dans le ratio de chacune des claudines présentes à la membrane affectant ainsi de façon positive ou négative la fonction de barrière. Les modulations d'expression de la claudine-1 et -2 ainsi que les modulations de la localisation de la E-cadhérine et de sa partenaire la β -caténine suggèrent des défauts dans la fonction de la barrière intestinale des souris *Smad5*^{ΔCEI}. Cette barrière épithéliale peut être présente et sembler tout à fait normale, mais elle peut, tout de même, posséder des défauts importants qui lors de l'apparition d'un stress supplémentaire, vont engendrer des problèmes

fonctionnels comme une perméabilité transcellulaire différente (Groschwitz et Hogan, 2009). Il est clair qu'aucun test de fonctionnalité n'a pas été effectué pour valider la fonctionnalité de la barrière en mesurant la perméabilité épithéliale chez ces souris mutantes. Ces tests, dont la mesure de la résistance trans-épithéliale de la muqueuse intestinale ainsi que le gavage au FITC-dextran, permettent de vérifier l'intégrité et la fonctionnalité de cette barrière (Blikslager *et al.*, 2007; Coulombe *et al.*, 2013). Évidemment, dans l'avenir, ces tests devraient être effectués sur les souris *Smad5*^{ΔCEI} afin de démontrer si à l'état basal, avant même un stress exogène, ces souris possèdent des défauts dans la perméabilité de la muqueuse intestinale.

4.1.3 *Smad5 et son implication dans les maladies inflammatoires intestinales.*

Dans la série de facteurs permettant la pathogenèse des maladies inflammatoires intestinales, on retrouve la barrière épithéliale et la fine régulation de la perméabilité transcellulaire intestinale (Odenwald et Turner, 2013). Comme précédemment mentionné, la perméabilité de la barrière épithéliale est régulée principalement par les protéines de jonctions serrées retrouvées au niveau du complexe apical de jonctions. L'expression et la distribution de ces protéines sont fréquemment altérées dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Bruewer *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2008). Par exemple, la claudine-1 est connue pour être diminuée dans les maladies inflammatoires intestinales. De plus, une étude regardant l'expression des claudines sur des biopsies de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales a démontré des variations différentes selon le type de claudines. Contrairement à la claudine-1, la claudine-2 semble être grandement augmentées dans ces maladies tandis que les claudine-5 et -8 sont diminuées elles aussi (Prasad *et al.*, 2005). De plus, la muqueuse subissant des dommages constants nécessite une réparation efficace des blessures le plus rapidement possible. Dans un état normal, la réparation de l'épithélium s'effectue en trois étapes successives soit la restitution, où l'on voit la dédifférenciation, l'étalement et la migration des cellules épithéliales, ensuite la prolifération de ces dernières et finalement la maturation et la différenciation de l'épithélium (Thompson *et al.*, 2000).

Des défauts dans les étapes de la réparation de la muqueuse contribuent aussi au développement des maladies inflammatoires intestinales (Sturm et Dignass, 2008). La signalisation du TGF- β possède une implication reconnue dans les processus de réparation

de la muqueuse au niveau des maladies inflammatoires intestinales (Fiocchi, 2001). Des études ont démontré, dans des tissus inflammés de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, que malgré le fort niveau d'expression du TGF- β 1, l'activité de cette signalisation, visualisé par phosphoSmad3, était grandement diminuée (Fiocchi, 2001). Par l'utilisation de modèles cellulaires et murins, les résultats démontrent que cette inhibition de la signalisation du TGF- β s'effectue par une surexpression du iSmad, Smad7 (Monteleone, G. *et al.*, 2008). La résultante de l'inhibition de la signalisation du TGF- β cause une production de cytokines pro-inflammatoires ce qui maintient l'inflammation et empêche la restitution épithéliale. Dans ces différentes études, l'augmentation d'expression de Smad7 a été seulement associée à des effets sur la signalisation du TGF- β . Toutefois, Smad7 est un iSmad qui possède la capacité d'interagir aussi avec les récepteurs des Bmps (Massagué, 1998). La signalisation des Bmps, pour sa part, est très peu étudiée dans les maladies inflammatoires intestinales. Il a été démontré que l'injection de Bmp7 peut favoriser la réparation de la muqueuse intestinale de rats soumis à une colite chimique (Maric *et al.*, 2003). Toutefois, la relation entre les éléments spécifiques de la voie des Bmps, comme Smad5, et la pathogénèse des maladies inflammatoires intestinales n'a pas encore été démontrée. Nos résultats suggèrent que Smad5 peut jouer des rôles essentiels dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette protéine est nécessaire pour réguler la localisation des protéines de jonctions adhérentes, d'importantes composantes du complexe apical de jonctions. De plus, Smad5 participe possiblement à influencer la perméabilité de la barrière intestinale via l'expression des protéines de jonctions serrées. En influençant ces processus, Smad5 pourrait jouer un rôle dans les maladies inflammatoires intestinales.

Les résultats obtenus dans notre étude nous confirment qu'il y a effectivement une modulation des éléments de la voie des Bmps au niveau de la muqueuse des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. Effectivement, on observe une diminution significative de l'ARNm du ligand Bmp2 et de l'effecteur Smad5 chez les patients atteints de maladie de Crohn et de colite ulcéreuse. D'autres éléments de la voie de signalisation sont aussi modulés différemment, comme l'antagoniste noggin qui est diminué seulement dans la colite ulcéreuse et l'effecteur Smad1 qui est grandement augmenté dans les deux

types de maladies. Ces résultats suggèrent que cette signalisation est modulée au niveau de ces maladies et ce, dépendamment des éléments de la voie. Le patron d'expression des mêmes éléments fut analysé sur un modèle murin de colite chimique et démontre une diminution de l'expression de l'ARNm du ligand Bmp2 et de l'effecteur Smad5 comme ce qui est observé chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales appuyant le premier résultat. De plus, l'état d'activation de la protéine Smad5 dans le modèle de colite chimique suit l'expression de l'ARNm avec une diminution des phosphorylations activatrices à deux et quatre jours de colite. Toutefois, on observe une augmentation de ces phosphorylations de la protéine Smad5 après le septième jour de colite chimique. Il est à noter que les niveaux totaux de la protéine Smad5 n'ont pas pu être évalués par manque d'anticorps spécifique. Il est donc difficile de conclure sur l'expression de la protéine ainsi que sur son réel état d'activation au cours de la colite chimique. Les modulations à la hausse des phosphorylations de Smad5 peuvent être dues à une plus grande expression de la protéine ou à une plus grande activation du récepteur des Bmps qui induit ces phosphorylations sur Smad5. Avec les résultats présentés, il est impossible de nier que ces variations de phosphorylations peuvent être aussi causées par des régulateurs intracellulaire comme des phosphatases (PP2A) spécifiques aux Smad. Afin d'obtenir de meilleures conclusions sur les modulations que subit la protéine Smad5 au cours de la colite chimique, il est primordiale de faire des analyses plus approfondies par immunobuvardage de cette protéine mais aussi de ses différents régulateurs. L'hypothèse de la réactivation de Smad5 au septième jour de colite suggère une implication de cet effecteur dans la phase de restitution. De plus, les résultats de cette étude démontre que Smad5 affecte la migration et probablement la dépolymérisation de l'actine dans les cellules épithéliales intestinales. Smad5 est exprimé à la fois dans le compartiment épithélial et mésenchymateux, la diminution d'expression de *Smad5* dans les biopsies de patients ainsi que dans les extraits de muqueuses murines ne peut être attribuable uniquement au compartiment épithélial. Toutefois, il est clair que l'utilisation du modèle murin possédant la délétion de Smad5 uniquement dans les cellules épithéliales intestinales a permis de mettre en évidence l'implication de cet effecteur dans la pathogenèse des maladies inflammatoires intestinales. En effet, les souris *Smad5*^{ΔCEI} sont plus susceptibles à un traitement DSS aigue de sept jours démontrant le rôle protecteur potentiel pour Smad5 face à la colite ulcéreuse

Quelques évidences permettent de suggérer que Smad5 posséderait des rôles dans la réparation de l'épithélium intestinal. L'augmentation des niveaux de phosphorylation après sept jours de colite chimique suggère une réactivation de la protéine Smad5. Ce résultat obtenu après sept jours d'induction de la colite suggère que Smad5 pourrait avoir un rôle dans la phase de réparation de blessures, qui commence dès les premières insultes face à l'épithélium. De plus, les souris *Smad5*^{ΔCEI} démontrent une migration incontrôlée qui pourrait venir interférer dans les processus de restitution survenant après une brèche à l'épithélium. De façon intéressante, un polymorphisme dans le gène de la E-cadhérine (*CDH1*) a été associé avec la maladie de Crohn (Muisse *et al.*, 2009). Cette étude démontre que sous des conditions normales, la relocalisation de la E-cadhérine n'est pas suffisante pour induire des défauts de polarisation de l'épithélium. Toutefois, dans le cas d'inflammation soutenue, la distribution cytoplasmique de cette protéine interfère avec sa fonction normale à la membrane latérale. Ceci affecte la repolarisation et la différenciation de la cellule épithéliale dans le processus de réparation et occasionne un épithélium non fonctionnel. Les souris *Smad5*^{ΔCEI} pour leur part, possèdent des défauts de localisation des protéines de jonctions adhérentes, principalement de la E-cadhérine, qui pourrait fortement interférer avec les processus de réparation intestinale. En effet, l'expérimentation de récupération suivant un traitement au DSS a mené au décès de 33% des souris *Smad5*^{ΔCEI}, démontrant l'incapacité de ces souris à récupérer. De plus, les analyses histologiques des muqueuses coliques des animaux ayant survécus confirment qu'aucune réparation n'a débuté chez les mutants, démontré par les photos H&E de muqueuses complètement dénudées d'épithélium.

Les patrons d'expression des Bmps dans les maladies inflammatoires intestinales et dans le modèle murin de colite ulcéreuse, en plus de la susceptibilité et du défaut de réparation face au traitement au DSS des souris *Smad5*^{ΔCEI} permettent d'émettre certaines hypothèses quant aux rôles possibles des Bmps dans ces pathologies. La première hypothèse est que la signalisation des Bmps, connue pour inhiber la prolifération pourrait être inhibée afin d'accroître le potentiel prolifératif des cellules épithéliales pour augmenter la régénération du tissu (Maric *et al.*, 2003). La deuxième hypothèse est que la réexpression

des éléments essentiels à son activation dans la phase tardive de la colite, comme c'est le cas pour la protéine Smad5, serait nécessaire pour favoriser la réparation de l'épithélium intestinal. Cette hypothèse est soutenue par l'étude du Bmp7 chez les rats traités de façon préventive, permettant de réduire grandement l'inflammation et d'accélérer la réparation de la muqueuse intestinale (Maric *et al.*, 2003). Il est fort possible que la signalisation des Bmps via Smad5 participe au processus de réparation dans les maladies inflammatoires par son implication dans la migration, mais aussi au niveau du complexe apical de jonction. De cette façon, Smad5 pourrait influencer l'intégrité de la barrière et la repolarisation nécessaire à la différenciation des cellules épithéliales lors de la réparation de blessure.

4.1.4 Volet 1 : Conclusions et perspectives

Les résultats de cette étude nous permettent d'affirmer que Smad5, un effecteur spécifique de la signalisation des Bmps, contrôle la migration et l'assemblage du complexe apical de jonctions des cellules épithéliales intestinales. En outre, il est suggéré que ces effets sont causés par une diminution de l'état de phosphorylation de la cofiline, qui est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. En ayant ces effets sur l'épithélium, Smad5 est un facteur de transcription qui va influencer l'intégrité de la barrière épithéliale et protéger contre tout stress à cet épithélium. Par ses capacités à influencer le complexe apical de jonctions et la migration, Smad5 a potentiellement une grande influence sur le processus de la réparation de la muqueuse intestinale. De plus, en comparaison avec les études précédentes, cette étude permet de suggérer que les autres effecteurs de la voie des Bmps, Smad1 et Smad8, possèdent des rôles spécifiques comme ceux de réguler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, deux phénotypes n'étant pas observés chez les souris *Smad5*^{ΔCEI}.

Il est évident que plusieurs expériences supplémentaires nécessitent d'être effectuées afin de confirmer les différents rôles suggérés pour Smad5 dans cette étude. Tout d'abord, le rôle de Smad5 au niveau de la régulation de l'état de phosphorylation mérite d'être investigué davantage. En effet, Smad5 étant un facteur de transcription et non une kinase, il est beaucoup plus probable que les effets de Smad5 médiés sur la cofiline soient indirects. Il faut donc tenter de déterminer si d'autres régulateurs de la cofiline, comme la Limk et

Ssh, peuvent être des cibles directes de Smad5. Ceci pourrait être vérifié chez les souris *Smad5*^{ΔCEI} au niveau de leurs ARN messager mais aussi de leurs protéines puisque des anticorps spécifiques contre ces deux cibles sont maintenant disponibles commercialement. Ces analyses permettraient de déterminer si l'on observe des modulations directes de leur expression en l'absence de Smad5 dans les cellules épithéliales intestinales. De plus, un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales, comme les Caco2 ou les T84 possédant l'inhibition de Smad5, par ARN interférant, peut être utilisé pour mieux comprendre le mécanisme de régulation de la cofiline sous-jacent la perte de Smad5. L'utilisation de ces modèles cellulaires bien établis permettrait une démonstration rapide et efficace du rôle Smad5 au niveau de la cofiline et du cytosquelette d'actine. L'utilisation d'entéroïdes, qui sont des mini-intestins en culture isolées de cellules souches épithéliales provenant de l'intestin ou du côlon des souris *Smad5*^{ΔCEI}, permettrait des analyses similaires *in vitro*. De plus, les entéroïdes permettrait de faire le parallèle avec le modèle murin, sans avoir toute la complexité du tissu. L'activation de la cofiline par sa déphosphorylation va lui permettre d'agir directement sur le cytosquelette d'actine afin de permettre le roulement des filaments d'actine. Il serait intéressant de vérifier l'état du cytosquelette des cellules épithéliales au niveau des souris *Smad5*^{ΔCEI}, par immunofluorescence en utilisant la phalloïdine pour marquer les filaments d'actine. De plus, le modèle cellulaire ou les entéroïdes pour les études *in vitro* seraient très utiles pour ces expérimentations. Ces approches permettraient de regarder directement les modulations que subit le cytosquelette d'actine, en absence de Smad5, au niveau basal et à la suite d'une blessure sur monocouche. Ceci permettrait de mettre en lumière si la migration s'effectue seulement de façon accélérée ou bien de façon incontrôlée.

De plus, les Caco2 et les T84 sont des cellules qui se polarisent et forment un complexe apical de jonctions lorsqu'elles sont à confluence. Pour ces raisons, elles sont aussi un excellent modèle pour vérifier l'implication de Smad5 dans l'assemblage des jonctions. En fait, il serait nécessaire de comprendre comment se comporteraient les cellules épithéliales en l'absence de Smad5 pour rétablir leurs jonctions. Le test de chélation du calcium par l'EDTA permet de déstabiliser les jonctions cellulaires et lors du rétablissement du calcium extracellulaire, il y a réassemblage du complexe apical de jonctions. Cette expérience serait

une expérience clé pour déterminer, si en l'absence de Smad5 et lors d'un stress (chélation du calcium), les jonctions se reforment correctement. L'hypothèse serait qu'après la déstabilisation des jonctions, il y aurait un retard et peut-être même une incapacité à réassembler les jonctions ce qui entrainerait des problèmes de perméabilité transcellulaire et affecterait la fonction de barrière.

Dans la même ordre d'idées, il s'agirait de mettre au point un traitement DSS qui amène moins de blessures à la muqueuse des souris *Smad5*^{ΔCEI}, soit en diminuant le pourcentage de DSS utilisé ou le nombre de jours de traitement. Le but est d'avoir des blessures pour lesquelles les souris survivront et qu'il sera possible de suivre la réparation. Il sera possible de vérifier les différents aspects des souris *Smad5*^{ΔCEI} suite à une blessure de la muqueuse que ce soit l'intégrité du complexe apical de jonctions, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales. Ces expériences vont permettre de démontrer le rôle spécifique de Smad5 dans la réparation de l'épithélium intestinal. De plus, ceci pourrait mettre en évidence des implications importantes pour la signalisation des Bmps et spécifiquement Smad5, au niveau des maladies inflammatoires intestinales.

Les fonctions associées à la signalisation des Bmps au niveau de l'homéostasie de l'intestin lui confèrent des rôles potentiels dans les différentes pathologies digestives. Notre étude a permis de démontrer pour la première fois un rôle spécifique pour l'effecteur Smad5 au niveau de l'intestin et l'intégrité de la barrière épithéliale. De plus, notre étude met en évidence le rôle de Smad5 dans la protection de la muqueuse contre les blessures et pour favoriser la réparation épithéliale, lui conférant une implication importante au niveau de la susceptibilité aux maladies inflammatoires intestinales. L'étude de la signalisation des Bmps et de Smad5 doit continuer afin d'améliorer le traitement de ces pathologies et de peut-être trouver de nouvelles façons de favoriser la réparation de la muqueuse intestinale.

4.2 Volet 2 : La signalisation mésenchymateuse des Bmps et la régulation du microenvironnement et de la polypose

La signalisation des Bmps est étudiée pour ses nombreux rôles au niveau du développement et de l'homéostasie de plusieurs tissus ainsi que dans diverses pathologies. Au niveau de tractus gastro-intestinal, les Bmps sont démontrés pour réguler principalement la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Les mutations, principalement du récepteur de cette voie, *Bmpr1a*, mènent à l'inactivation de la signalisation de Bmps et une augmentation de la prolifération cellulaire qui va causer l'induction de la polypose. De façon majoritaire, les mutations du gène *BMPRIA* sont retrouvées dans le JPS causant plusieurs polypes au niveau de l'intestin et du côlon. Certaines mutations dans cette voie de signalisation sont aussi retrouvées dans le cancer colorectal au niveau de la progression tumorale. Plusieurs études ont tenté de déterminer de façon cellule-spécifique qu'elle était la contribution de la signalisation de Bmps dans cette pathologie. En effet, des modèles murins différents possédant l'inactivation de la signalisation des Bmps dans certains compartiments cellulaires de la muqueuse ont démontré des résultats très similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de JPS, soit une augmentation de la prolifération associée à l'activation soutenue de la voie Wnt/ β -caténine et une induction de la polypose (Haramis *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004). En contre partie, la délétion de la signalisation des Bmps strictement à l'épithélium intestinal est incapable d'induire la formation de polypes (Auclair *et al.*, 2007). Ces résultats mis ensemble suggèrent un rôle de la signalisation des Bmps dans les cellules extra-épithéliales pour l'induction de la polypose.

4.2.1 La signalisation mésenchymateuse des Bmps et la muqueuse colique

Les résultats présentés dans cette étude démontrent que la signalisation des Bmps au niveau du mésenchyme, plus spécifiquement des myofibroblastes, est essentielle pour conserver un microenvironnement assurant l'homéostasie de la muqueuse colique. En fait, la délétion de *Bmpr1a* dans cette sous-population est capable à elle seule d'induire la polypose dans le côlon et supporte l'idée que la signalisation des Bmps mésenchymateuse peut participer à l'initiation de la tumorigenèse. La signalisation des Bmps permet de contrôler l'homéostasie du myofibroblaste afin de conserver l'équilibre du tissu. Ayant un rôle très bioactif au niveau de la muqueuse intestinale, les dérégulations de leurs comportements vont apporter des conséquences au niveau de l'homéostasie du microenvironnement de la niche des cellules souches ainsi que celui de tout l'épithélium

colique. Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} possèdent des régions affectées qui sont caractérisées par des dérégulations du nombre de fibroblastes et de myofibroblastes, une accumulation de plusieurs éléments de la matrice extracellulaire, ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires (Figure 40). Avec l'âge, ces souris démontrent l'apparition de prolapsus rectaux qui sont causés par la croissance de polypes coliques qui peuvent entraîner des difficultés à passer les selles pour l'expulsion. Ainsi ces résultats soutiennent l'idée que la délétion de *Bmpr1a* dans un nombre limité de myofibroblastes est suffisante pour influencer le stroma en entraînant une transdifférenciation des fibroblastes et autres cellules précurseurs en myofibroblastes résultant en un impact profond sur le microenvironnement et l'homéostasie épithéliale.

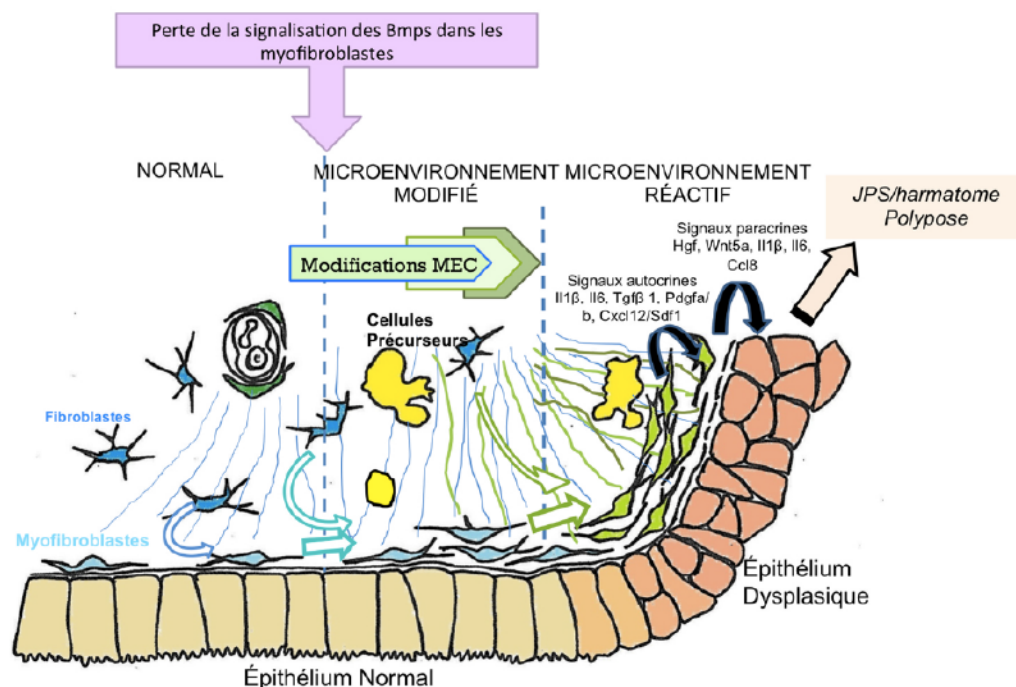


Figure 40. Séquence d'évènement dans la muqueuse à la suite de la perte de la signalisation mésenchymateuse des Bmps.

La perte précoce de la signalisation mésenchymateuse des Bmps induit l'adaptation des myofibroblastes en un mésenchyme réactif permettant le développement de la polypose colique et le Syndrome de Polypose Juvenile (JPS). Durant la phase du développement du microenvironnement modifié, l'épithélium reste normal tandis que le stroma est modifié au niveau cellulaire par l'augmentation du nombre de myofibroblastes et de cellules immunes mais aussi au niveau des composants de la matrice extracellulaire. Avec le temps, le microenvironnement modifié attire des cellules précurseurs et stimule leur transdifférenciation en myofibroblastes additionnels. Ces nouveaux myofibroblastes vont ultimement contribuer à modifier le milieu extracellulaire créant un microenvironnement toxique par la production élevée de cytokines et de facteurs de croissance. La pression du

microenvironnement toxique sur les cellules épithéliales va mener à des modifications importantes de leurs fonctions cellulaires permettant la progression vers l'initiation de la tumorigenèse ou du JPS. F, fibroblastes; P, péricytes; IC, cellules immunes; M, myofibroblastes; M*, myofibroblastes provenant de la transdifférenciation de cellules précurseurs; PC, cellules précurseurs. Figure prêtée généreusement par la Pre Nathalie Perreault.

Un des premiers phénotypes observés macroscopiquement chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} est l'apparition de prolapsus rectaux vers l'âge de 9 mois. Les prolapsus rectaux se présentent lorsqu'il y a un relâchement des muscles et ligaments du rectum, permettant l'extrusion du tube digestif par l'anus. Les prolapsus rectaux sont des signes cliniques de pathologies digestives causés par les diarrhées sévères comme dans le cas des maladies inflammatoires intestinales ou par une constipation causée par l'obstruction de tube digestif comme c'est le cas dans le cancer colorectal. L'observation des prolapsus rectaux s'est accompagnée par la présence de polypes au niveau du côlon moyen des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Vers l'âge de 1 an, les polypes sont beaucoup plus nombreux et très visibles à l'œil nu. La présence de régions dysplasiques, à un plus jeune âge chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, qui possèdent les mêmes caractéristiques que les polypes et qui sont en nombre croissant avec l'âge, suggère que ce sont ces mêmes régions qui ont évoluées en polypes avec le temps.

Une des particularités de ce modèle est le phénotype qui a un patron très mosaïque à travers le côlon. Vers 1 mois, aucune différence phénotypique n'est visible malgré la présence de myofibroblastes ayant la délétion du récepteur *Bmpr1a*. Vers 3 mois, les régions dysplasiques sont bien délimitées mais en nombre restreint et elles augmentent avec l'âge pour finalement se développer en polypes vers 1 an. Le fait que ce ne soit pas le côlon entier qui soit affecté par le phénotype nous suggère quelques hypothèses. Tout d'abord, il est possible que la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Foxl1* possède une activité mosaïque (Sackett *et al.*, 2007). Cette activité mosaïque de la Cre permet de créer un modèle beaucoup plus près de la réalité de la pathogenèse de cancer colorectal puisque dans cette pathologie, ce ne sont pas toutes les cellules épithéliales qui sont tumorales. De plus, certaines études, jusqu'à ce jour très bien citées au niveau du cancer colorectal, ont expérimenté une activité mosaïque de la Cre, leur permettant tout de même d'obtenir un

phénotype se rapprochant du cancer colorectal et sont maintenant des modèles très acceptés pour les études de la carcinogenèse colorectale (Barker *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2011). Dans notre étude, malgré un nombre limité de myofibroblastes qui possèdent la délétion du récepteur *Bmpr1a*, il y a un développement de dysplasie épithéliale qui évolue en polypose vers l'âge de 9 à 12 mois. La dispersion et le faible taux d'inhibition de la signalisation des Bmps au niveau du mésenchyme suivie par un phénotype significatif démontre du rôle important que joue cette signalisation et les myofibroblastes dans l'homéostasie de côlon.

Une autre observation précurseuse à l'apparition de la polypose est l'augmentation de la prolifération cellulaire tant au niveau des cellules épithéliales que des cellules mésenchymateuses. Ces différences sont observables dès 90 jours mais seulement dans les régions dysplasiques de souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. La dérégulation de la prolifération cellulaire engendre souvent l'hyperplasie d'un tissu qui nécessite une augmentation du nombre de cellules le composant. Il n'est pas étonnant que ce phénotype dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} va engendrer le développement de polypose colique. Le compartiment cellulaire dans lequel se produit l'augmentation initiale de prolifération cellulaire n'a pas pu être identifié, puisque les différentes observations sont seulement associées aux régions dysplasiques. Le phénotype dispersé de ce modèle murin rend les interprétations difficiles quant aux événements initiateurs de toutes ces dérégulations. Les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent des augmentations du nombre de myofibroblastes, des modulations des cytokines et des facteurs de croissance dans les polypes qui peuvent influencer l'activation et la différenciation de ces cellules. Des études ont démontré que l'activation et l'augmentation des myofibroblastes dans un contexte pathologique sont souvent associées à une hausse de leur prolifération cellulaire (Luna *et al.*, 2011; Otranto *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Des expériences *in vitro* effectuées sur le modèle cellulaire 18Co ont démontrés que les facteurs de croissance PDGF, EGF, FGF2, et IGF ainsi que les cytokines IL1β et TNFα sont capables d'induire une réponse proliférative (Jobson *et al.*, 1998). Néanmoins, les voies de signalisations qui régulent intrinsèquement la prolifération demeurent à être déterminées. Tous ces résultats mis ensemble suggèrent que les dérégulations du microenvironnement

dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} peuvent contribuer à rendre les myofibroblastes et autres cellules mésenchymateuses plus prolifératives.

Au niveau des cellules épithéliales, les modulations du microenvironnement, que ce soit la sécrétion de facteurs de croissance ou les éléments de la matrice extracellulaire, vont modifier les interactions épithéliales-mésenchymateuses influençant directement leur comportement. Le modèle de souris transgéniques ayant l'inhibition de la signalisation des Hh spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal est un bon exemple pour illustrer ce concept (Madison *et al.*, 2005). Ces souris démontrent une augmentation des cellules de muscles lisses ainsi qu'une diminution des myofibroblastes amenant des modifications de la voie des Wnt et Bmp. Ces modifications de voies de signalisation vont directement affecter l'épithélium en engendrant une augmentation de la prolifération et la formation de cryptes ectopiques dans la villosité (Madison *et al.*, 2005). Les analyses de cette étude se sont concentrées principalement sur le compartiment mésenchymateux sous-jacent aux cellules épithéliales. Les cellules épithéliales sont en contact direct avec le microenvironnement et la matrice extracellulaire par les interactions avec divers récepteurs retrouvés au niveau de ces cellules. Les modifications du microenvironnement retrouvées dans les régions dysplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} sont suffisantes pour amener des répercussions sur l'épithélium. En effet, dans ces souris, la prolifération des cellules épithéliales est augmentée dans les régions dysplasiques et dans les polypes. Aucun mécanisme n'est réellement mis de l'avant pour expliquer ces répercussions sur l'épithélium, puisque plusieurs expérimentations seraient nécessaires pour déterminer comment les modifications du myofibroblaste engendrent des impacts sur la prolifération des cellules épithéliales. Certaines molécules étant augmentées au niveau des polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} comme le HGF, peuvent affecter directement la prolifération épithéliale. En effet, le HGF est un facteur de motilité et de croissance sécrété par les myofibroblastes et qui agit uniquement sur les cellules épithéliales pour promouvoir leur prolifération cellulaire et la régénération de blessures (Itoh *et al.*, 2004). Une étude a démontré que les fibroblastes étaient responsables de la sécrétion de HGF dans un modèle murin de CAC. La délétion conditionnelle de la sérine-tréhonine kinase Tlp2 dans les fibroblastes intestinaux mène à une augmentation de la sécrétion de HGF, ce qui

promouvoit la tumorigenèse des cellules épithéliales (Koliaraki *et al.*, 2012). Il serait possible que l'augmentation de HGF, à la suite de la perte d'inhibition de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes, soit suffisante pour causer cette augmentation de prolifération dans les cellules épithéliales. Ce point pourraient ce réaliser en regardant l'activation de la voie du HGF au niveau de l'épithélium des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le ligand HGF va lier son récepteur c-Met, retrouvé au niveau des cellules épithéliales, activant ce dernier et permettant le recrutement de protéines adaptatrices comme Gab1 (*Growth Factor receptor-boud protein2 associated binding protein 1*) et Grb (*Growth Factor receptor-boud protein2*). Ces protéines adaptatrices permettent l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme (Akt, Jnk, et MAPK) pour promouvoir la prolifération et la motilité cellulaire (Organ et Tsao, 2011). Il est donc possible de vérifier l'activation de la voie de signalisation du HGF, dans des enrichissement d'épithélium provenant des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, en regardant les phosphorylations spécifiques du récepteur et des protéines adaptatrices par immunobuvardage. De plus, par la même technique, il serait possible de vérifier l'activation des autres voies de signalisation en aval du HGF, afin de vérifier si celles-ci corrélaient avec l'augmentation de prolifération au niveau des cellules épithéliales.

Les modifications des éléments de la matrice extracellulaire comme les collagènes et la fibronectine peuvent contribuer à augmenter la prolifération des cellules épithéliales puisque ces dernières interagissent directement avec ces éléments via leurs intégrines. Au niveau de l'intestin et du côlon, les intégrines sont exprimées par tous les types cellulaires et permettent aux cellules de réagir aux modifications de leur environnement. Au niveau des cellules épithéliales, les intégrines sont responsables de contrôler leur survie, leur prolifération et leur différenciation suite à leur attachement avec la fibronectine au niveau de la matrice extracellulaire (Lussier *et al.*, 2000). Les intégrines se retrouvent sous deux formes, soit la chaîne α et la chaîne β et elles vont s'associer sous différentes combinaisons pour former des complexes d'intégrines spécifiques. Le complexe d'intégrine $\alpha1\beta1$ et le complexe $\alpha2\beta1$ lient la laminine 1 et le collagène IV retrouvé au niveau de la lame basale alors que le complexe $\alpha5\beta1$ lie spécifiquement la fibronectine et le complexe $\alpha9\beta1$ lie la tenascine C au niveau de la matrice extracellulaire (Lussier *et al.*, 2000). Par exemple, au

niveau des cellules épithéliales intestinales, le complexe d'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ va lier la fibronectine de la matrice extracellulaire et il va engager la cascade de signalisation MAPK-Ras-ERK pour permettre de réguler la prolifération des cellules épithéliales (Wary *et al.*, 1996). Le complexe d'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ agit comme co-récepteur à l'EGF et permet d'induire cette cascade de signalisation intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales afin de promouvoir la migration cellulaire (Lussier *et al.*, 2000). Il est fort possible qu'en modifiant la quantité de fibronectine ou des autres éléments de la matrice extracellulaire déposés sous les cellules épithéliales, ceci changera les interactions avec les intégrines et leur signalisation intracellulaire, notamment la voie MAPK ou la voie de signalisation à l'EGF. De plus, avec ces évidences, il est possible que certaines signalisations engagées affectent directement les niveaux d'expression des intégrines pour permettre d'augmenter la prolifération et obtenir un nombre de cellules épithéliales suffisant pour suivre les modifications du mésenchyme. En contre partie, les myofibroblastes expriment aussi différents complexes d'intégrines ($\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 5$, $\alpha 11 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 7$) qui vont activer différentes voies de signalisation dont celle du TGF- β afin de promouvoir la différenciation des myofibroblastes (Klingberg *et al.*, 2013). Toutefois, les intégrines et leurs signalisations intracellulaires respectives n'ont pas été étudiés dans notre modèle, limitant donc l'interprétation à de simples hypothèses.

4.2.2 La signalisation des Bmps et le myofibroblaste

Les souris *Bmpr1a* ^{Δ MES} possèdent une perte de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes dès l'âge de 30 jours, démontrée par une immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre phosphoSmad1-5-8. À cet âge, les souris mutantes ne développent pas de phénotype perceptible comparativement aux souris de 90 jours. De façon étonnante, les régions dysplasiques des souris de 90 jours possèdent peu de myofibroblastes ayant l'inhibition de la signalisation des Bmps. La démonstration de la recombinaison des allèles de *Bmpr1a* confirme l'activité de la Cre dans le mésenchyme de souris *Bmpr1a* ^{Δ MES} adultes. Ce résultat nous permet de suggérer que malgré la grande difficulté à suivre l'inhibition de la délétion de *Bmpr1a* avec le phénotype, elle est tout de même maintenue dans le temps. Similairement aux souris de 90 jours, les polypes des souris *Bmpr1a* ^{Δ MES} de 1 an ne possèdent aucun myofibroblaste ayant la délétion de la signalisation des Bmps, et ce

malgré la grande augmentation du nombre de ces cellules. Ces résultats contradictoires permettent d'émettre certaines hypothèses au sujet du devenir des myofibroblastes qui subissent la délétion de *Bmpr1a*. Il est possible que les myofibroblastes ayant l'inhibition constante de la signalisation des Bmps soient incapables de survivre pour une longue période de temps. En effet, les résultats de l'essai TUNEL pour visualiser l'apoptose démontrent qu'il y a une augmentation des cellules apoptotiques mésenchymateuses au niveau des régions dysplasiques et des polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} de 90 jours et 1 an respectivement. Toutefois, ces cellules mésenchymateuses apoptotiques n'ont pas été clairement identifiées vu l'incompatibilité des différents marquages. Avec ces résultats, il est impossible de confirmer qu'il s'agit de myofibroblastes apoptotiques, mais cela permet une corrélation avec l'hypothèse de la mort des myofibroblastes qui possèdent la délétion de *Bmpr1a*. Certaines expériences supplémentaires sont essentielles afin de déterminer si la perte de la signalisation des Bmps est suffisante pour induire l'apoptose des myofibroblastes.

Il est démontré qu'en mourant, les myofibroblastes sécrètent des niveaux dérégulés de cytokines (Il1 β , Il6), de facteurs de croissance (TGF- β), ainsi que différents éléments de la matrice extracellulaire (Tn-c) (Vaheri *et al.*, 2009). Ces molécules spécifiques (Il1 β , Il6, TGF- β) ont été démontrées pour avoir un pouvoir pro-apoptotique sur les myofibroblastes (Francoeur *et al.*, 2009). Ainsi, de plusieurs façons différentes, ces molécules contribuent au développement d'un mésenchyme réactif, car en plus de promouvoir l'apoptose des myofibroblastes, elles stimulent l'attraction et la transdifférenciation des cellules précurseurs en de nouveaux myofibroblastes. En effet, différentes études ont démontré que le nombre accru de myofibroblastes retrouvé dans les pathologies digestives vient de l'activation et la différenciation de cellules précurseurs provenant de différentes origines comme les cellules dérivées de la moelle osseuse, les fibroblastes et les péricytes (Otranto *et al.*, 2012; Quante *et al.*, 2011; Worthley *et al.*, 2013). Puisque l'apoptose des myofibroblastes dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} n'a pas été spécifiquement démontré, il est impossible de conclure que ces molécules sont sécrétées (Il1 β , Il6, Cxcl12, TGF- β) dans le microenvironnement par des myofibroblastes apoptotiques. Toutefois, les résultats obtenus des polypes isolés des souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent des hausses des niveaux des ARNm

contrôlant l'expression protéique de ces molécules (Tableau 10). Ainsi, dans ce modèle murin, l'augmentation de l'ARNm $Il1\beta$, $Il6$, $Cxcl12$ et $TGF-\beta$ ainsi que la forte déposition des éléments de la matrice extracellulaire peuvent promouvoir l'infiltration et l'activation de cellules sanguines précurseurs. Ces cellules précurseurs en contact avec ces molécules vont se différencier en myofibroblastes activés, ce qui va contribuer fortement à l'amplification du phénotype. Il est démontré que les régions dysplasiques ainsi que les polypes des souris $Bmpr1a^{\Delta MES}$ possèdent une augmentation du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules immunes. Ces résultats permettent de renforcer l'hypothèse voulant que la différenciation de cellules précurseurs pourrait contribuer à ce phénotype et promouvoir les modifications du microenvironnement menant jusqu'à la polypose (Figure 40).

4.2.3 La signalisation des *Bmps* mésenchymateuse et le microenvironnement

Les leçons apprises des études développementales démontrent que les cellules mésenchymateuses et leur signalisation sont instructives pour l'épithélium intestinal (McLin *et al.*, 2009; Zorn et Wells, 2009). De plus, il est maintenant établi que la suite complète des événements génétiques survenant dans les cellules épithéliales est insuffisante pour récapituler entièrement la cascade d'initiation et de développement du cancer colorectal. Toutes ces évidences mettent l'accent sur l'importance de l'environnement dans ce contexte. Un microenvironnement pathologique, principalement l'environnement tumoral, est souvent caractérisé par une augmentation du nombre de myofibroblastes (Beacham et Cukierman, 2005; Glaire *et al.*, 2012). Cette altération dans la proportion des cellules mésenchymateuses va modifier la composition de la matrice extracellulaire, la production de facteurs de croissance ainsi que la sécrétion de cytokines au niveau du milieu environnant (De Boeck *et al.*, 2013; Polanska et Orimo, 2013; Torres *et al.*, 2013). Ces modifications biochimiques et cellulaires peuvent engendrer des effets sur les propriétés des cellules épithéliales affectant leur homéostasie. De plus, un microenvironnement toxique, comme celui retrouvé dans la pathologie du cancer, peut promouvoir la croissance tumorale dans les étapes précoces et tardives de la carcinogenèse (Karagiannis *et al.*, 2012). Ce qui est le plus intéressant, c'est que les polypes des souris $Bmpr1a^{\Delta MES}$ présentent des altérations au niveau de leur stroma et aussi du microenvironnement qui sont très similaires

à celles retrouvées dans le microenvironnement tumoral (De Boeck *et al.*, 2013; Karagiannis *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2012). En effet les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} en bas âge développent des régions dysplasiques possédant déjà des modifications importantes du stroma. Les régions dysplasiques présentent une accumulation de collagène I, collagène IV et de fibronectine, ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires bien avant l'apparition de la polypose. Ces résultats suggèrent que les myofibroblastes entourant les cellules épithéliales nécessitent la signalisation des Bmps pour réguler la composition normale du stroma. De plus, les résultats confirment que les polypes possèdent les mêmes dérégulations de la composition du stroma que celles retrouvées dans les régions dysplasiques confirmant qu'il y a bien une évolution du phénotype et de ces régions dans le temps. Ces résultats concordent avec les différentes études révélant les modifications du microenvironnement retrouvé au niveau des tumeurs colorectales, comme l'augmentation de cytokines (Il1 β , Il6, Il8, Ccl2, Ccl8, Ccl11), d'éléments de matrice extracellulaire (collagène IV, fibronectine, tenascine C) et de marqueurs de myofibroblastes activés (Cxcl12, TGF- β) (De Boeck *et al.*, 2013; Karagiannis *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2012). Les résultats retrouvés aux niveaux de ces souris démontrent bien que des modifications génétiques au niveau des myofibroblastes sont suffisantes pour générer des modifications du stroma se rapprochant grandement de celles retrouvées dans les cancers colorectaux. Ceci renforce grandement le principe selon lequel les cellules mésenchymateuses peuvent participer dans l'initiation et la progression tumorale.

Toutefois, dans ce modèle murin, les cellules épithéliales de régions dysplasiques ne semblent pas subir de modifications dans leur statut de différenciation et dans leur état néoplasique. En effet, le rapport de la pathologiste vétérinaire concernant l'évaluation des régions dysplasiques dénote la présence de cellules épithéliales pleinement matures, différenciées et non néoplasiques. Il est donc impossible de conclure que la perte de signalisation des Bmps dans les myofibroblastes est suffisante pour engendrer des cellules pré-tumorales. Comme discuté précédemment, les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} possèdent une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales et ce dans les régions dysplasiques et dans les polypes. Il est clair que les modifications du mésenchyme ont un impact sur la cellule épithéliale. Toutefois, elles sont insuffisantes pour engendrer leur modification en

cellules tumorales. La pression constante de cet environnement avec l'ajout d'un stress extérieur serait probablement capable d'amener ces lésions à un état d'adénomes. Par exemple, un état d'inflammation chronique ou des modifications génétiques acquises au niveau des cellules épithéliales sont des situations qui ajouteraient un stress extérieur à la pression du microenvironnement. L'utilisation de modèles recréant ces situations permettrait de vérifier deux cascades de carcinogenèse différentes soit celle du cancer associé à la colite et celle du cancer colorectal sporadique.

4.2.4 Volet 2 : Conclusions et perspectives

L'utilisation de ce modèle murin possédant une délétion spécifique de *Bmpr1a* dans les cellules mésenchymateuses a permis de démontrer le rôle important de cette signalisation dans ce compartiment cellulaire. En effet, la perte de cette signalisation mène à plusieurs modifications du compartiment mésenchymateux et du microenvironnement. Dès l'âge de 90 jours, les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} présentent des régions dysplasiques dans leur côlon moyen qui vont se développer en polypes entre l'âge de 9 mois à 1 an. Les principales caractéristiques associées à cette perte de signalisation sont l'augmentation des éléments de la matrice extracellulaire ainsi que l'augmentation du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes. Les cellules immunitaires sont aussi grandement augmentées dans les régions dysplasiques tout comme dans les polypes.

Bien que nous ayons caractérisé en profondeur ce phénotype, plusieurs questions nécessitent d'être investiguées afin de mieux comprendre l'implication de la signalisation des Bmps dans le côlon et les pathologies digestives. Tout d'abord, afin de bien élucider le mécanisme d'action des Bmps au niveau des myofibroblastes, il est nécessaire de comprendre ce qui se passe à l'intérieur de ces cellules mêmes. Puisque nous n'avons pas réussi l'isolation des myofibroblastes ayant la perte du récepteur *Bmpr1a*, il serait intéressant de s'attarder aux hypothèses discutées plus haut, comme celle de la mort des myofibroblastes possédants la perte de *Bmpr1a*. L'utilisation de myofibroblastes isolés de souris contrôles et par la suite inhibés pour la signalisation des Bmps via des traitements pharmacologiques pourrait être une façon de déterminer si un gradient d'activité des Bmps peut affecter le devenir et la mort cellulaire du myofibroblastes. Toutefois, cette preuve ne

serait faite qu'à l'étape *in vitro* et non directement dans un animal. La visualisation par triple marquage par immunofluorescence pourrait s'avérer être une technique suffisante afin de vérifier cette hypothèse. Jusqu'à maintenant, cette tentative pour cette technique s'est avérée insatisfaisante. Il est probable que l'utilisation d'un essai TUNEL possédant une sonde fluorescente différente permettant de visualiser l'apoptose pourrait optimiser cette technique. En effet, le défi est de pouvoir mettre la technique de visualisation de l'apoptose en combinaison avec les anticorps pour identifier par immunofluorescence les myofibroblastes n'ayant pas l'activation de la signalisation des Bmps, comme à la figure 25, et qui sont simultanément en apoptose.

L'hypothèse de la mort des myofibroblastes est une hypothèse qui tient bien la route et qui est supportée par le fait que cette mort cellulaire peut engendrer l'attraction et la différenciation de cellules précurseurs en myofibroblastes (Vaheri *et al.*, 2009). Afin de vérifier si les myofibroblastes meurent et recrutent de nouvelles cellules précurseurs provenant de la moelle osseuse entre autres pour assurer leur présence dans le tissu, il serait intéressant d'effectuer des expériences de transplantation de cellules souches de moelle osseuse. En effet, ces expérimentations permettent de visualiser si certaines cellules différenciées du tissu proviennent de la différenciation de cellules souches de la moelle osseuse. Brièvement, pour ce faire, il suffit d'irradier une souris femelle, afin de ne plus avoir de cellules sanguines qui viendraient interférer dans la transplantation. Cette souris femelle va subir la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse pluripotentes provenant d'une souris mâle. Ainsi, les cellules de la moelle osseuse seront les seules disponibles pour venir compléter le manque de myofibroblastes si le phénotype nécessite l'infiltration et la différenciation de ces cellules sanguines. Il est à noter que puisque ces cellules sanguines proviennent d'une souris mâle, elles peuvent être identifiées et discriminées des autres cellules par l'utilisation d'anticorps ciblant le chromosome y. Cette expérimentation permettrait de comprendre si les cellules sanguines participent à l'augmentation du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes dans les phénotypes des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Toutefois, elle ne répondrait pas à la question concernant le devenir des myofibroblastes possédant la délétion du récepteur *Bmpr1a*.

Une autre façon de déterminer ce qui se passe réellement dans les myofibroblastes qui perdent la signalisation des Bmps serait d'utiliser un modèle de délétion inductible et de suivre les myofibroblastes dans le temps. Afin de représenter un phénotype similaire, il est primordial que ce modèle inductible n'utilise pas de médiateurs d'inflammation comme l'interféron pour induire la délétion comme on le voit dans le modèle murin utilisant la *Mx1Cre* pour cibler l'épithélium. Pour cette expérimentation, il serait intéressant d'utiliser la souris *Col1a2Cre^{ETR2}* qui permet de cibler les fibroblastes et les myofibroblastes. De plus, avec ce modèle de Cre recombinase, la délétion est induite par l'injection de tamoxifène qui potentiellement produit une moins grande réaction inflammatoire au sein du tissu ciblé que l'injection de l'interféron. Ainsi, il serait possible de regarder l'effet de la délétion de *Bmpr1a* dans le temps sur les myofibroblastes. Toutefois, il est à noter, que certaines conclusions pourraient être limitées par le fait que ce modèle affecterait aussi la population de fibroblastes au niveau de la muqueuse colique. De plus, il est possible que l'utilisation de ce modèle qui cible les myofibroblastes et les fibroblastes amènerait un phénotype plus pénétrant et sévère.

Les différents résultats ainsi que le phénotype important développé par les souris *Bmpr1a^{ΔMES}* permettent de confirmer que la signalisation des Bmps dans le mésenchyme est essentielle pour maintenir l'homéostasie colique. De plus, il est évident que cette délétion permet l'initiation de la polypose et pourrait facilement augmenter le risque de développer le cancer colorectal comme on le voit chez les patients atteints du JPS. Toutefois, malgré l'âge avancé des souris, aucun adénome ne s'est formé dans ce modèle murin démontrant qu'à elle seule cette délétion ne peut mener à la formation du cancer colorectal. C'est pourquoi il serait intéressant de vérifier si une pression supplémentaire au niveau de l'épithélium pourrait être suffisante pour engendrer le développement rapide d'adénomes et de peut-être de promouvoir la progression en carcinomes. Pour soumettre l'épithélium à des stress supplémentaires, le DSS peut être utilisé pour créer une situation inflammatoire et l'AOM (Azoxyméthane) peut être utilisé comme agent carcinogène afin d'affecter l'épithélium. Les traitements AOM/DSS sont reconnus pour favoriser le développement d'adénomes dans le côlon de souris (Shaker *et al.*, 2010). Il s'avèrerait utile

de traiter les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} avec ces produits afin de vérifier si cette pression supplémentaire peut conduire à une amplification du phénotype. Une autre façon de créer une pression sur l'épithélium favorisant le développement d'adénomes est l'utilisation de modèle de souris KO possédant des modifications de suppresseur de tumeurs comme la souris *APC/Min*⁺ ou d'oncogène comme la souris *TP53*^{-/-} (Jacks *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1990). Le modèle de souris *APC/Min*⁺ possède l'apparition d'adénomes dans le côlon à un jeune âge qui n'évoluent pas en carcinomes. Le modèle de souris *APC/Min*⁺ est souvent utilisé pour voir l'effet combinatoire de certaines protéines avec la mutation du gène APC (Moser *et al.*, 1990). Ainsi lorsque ces souris seront croisées avec les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}, elles vont permettre de déterminer si la présence mutuelle de modifications à l'épithélium et la délétion de *Bmpr1a* dans les myofibroblastes permet d'amplifier l'apparition de polypes et mener au développement de carcinomes. Le modèle de souris *TP53*^{-/-}, pour sa part, est différent puisqu'habituellement il ne se forme pas des polypes au niveau du côlon. En fait, les souris *TP53*^{-/-} sont viables et elles sont hautement susceptibles à développer des cancers de types sarcome ou lymphome, ce qui leur donne une espérance de vie de seulement 6 mois limitant la formation de tumeurs dans l'intestin (Jacks *et al.*, 1994). Dans le cancer colorectal, les mutations dans le gène *TP53* se retrouvent vers la fin de la séquence d'évènements génétiques pour assurer la transition entre les étapes d'adénome vers le carcinome. L'utilisation de ces souris *TP53*^{-/-} croisées avec les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} va permettre de vérifier si la présence additionnelle de modifications à l'épithélium permet d'initier l'apparition d'adénomes au lieu de polypes bénins comme retrouvés normalement dans les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Ces différents modèles vont permettre de vérifier si la combinaison d'un stress constant à l'épithélium avec une mutation dans les myofibroblastes est capable d'initier la carcinogenèse colorectale et même de mener au développement de carcinomes.

Le travail effectué avec cette recherche permet d'affirmer que la signalisation des Bmps dans le mésenchyme est essentielle à l'homéostasie de la muqueuse colique. De plus, la perte de cette signalisation principalement dans les myofibroblastes est capable à elle seule d'induire plusieurs modifications du microenvironnement qui vont mener à l'apparition de la polypose. Toutefois, cette délétion est insuffisante pour mener au

développement de lésions précancéreuses comme les adénomes suggérant qu'un stress supplémentaire à la muqueuse est nécessaire afin de favoriser le développement du cancer lorsque l'on fait face à une perte de signalisation des Bmps mésenchymateuse.

4.3 Volet 3 : La signalisation des Bmps dans le myofibroblaste

La signalisation de Bmps peut maintenant être reconnue pour jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie intestinale et colique tout en ayant aussi des implications dans le syndrome de JPS. Les études antérieures au niveau de l'intestin démontrent que la signalisation des Bmps contrôle efficacement la prolifération des cellules épithéliales et l'initiation de la polypose. Toutefois, ces modèles murins possédaient une inhibition de la signalisation des Bmps dans plusieurs types cellulaires de la muqueuse rendant impossible de démontrer le type cellulaire responsable et initiateur de la polypose qu'on retrouve dans le JPS. Les études précédentes du laboratoire ont démontré que la signalisation épithéliale des Bmps est insuffisante pour induire la polypose, mais elles ont confirmé son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire. De façon similaire, l'étude effectuée lors du volet 2 a permis de démontrer que la signalisation des Bmps chez les myofibroblaste est primordiale à l'homéostasie du côlon et que sa délétion permet l'initiation de la polypose associée à des modifications du microenvironnement stromal. Les myofibroblastes représentent une faible proportion des cellules de la muqueuse colique et sont un type cellulaire difficilement isolable et visualisable. D'autant plus dans le modèle murin *Bmpr1a*^{ΔMES}, la délétion du récepteur *Bmpr1a* dans les myofibroblaste s'effectue de façon plutôt discontinue tout le long du côlon. Ceci rend la détermination de l'évènement initiateur complexe. Il s'avère donc très important de découvrir qu'elles sont les modulations initiales qui pourraient engendrer ce phénotype chez les souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Le modèle cellulaire des 18Co s'avère adéquat pour répondre à cette question tout en permettant de manipuler avec précision la voie de signalisation des Bmps.

4.3.1 La signalisation des Bmps dans le myofibroblaste

Afin de tenter de faire un parallèle avec le modèle murin précédemment utilisé, la signalisation des Bmps est inhibée de deux façons différentes dans les cellules 18Co, un modèle de myofibroblastes coliques humains. La signalisation des Bmps est inhibée dans les deux conditions (18Co^{shBmpr1a} vs 18Co^{LDN193189}) et permet d'augmenter la certitude et la spécificité du mécanisme d'action sous jacent à la perte de signalisation des Bmps dans ce type cellulaire. Tout d'abord, les gènes cibles bien connus des Bmps, *ID1*, *ID2* et *ID3*, sont diminués dans les deux conditions. De plus, la plus grande variation d'expression des ARNm s'observent pour les gènes *ID1* et *ID3*, les deux *ID* exprimés principalement dans le compartiment mésenchymateux. En effet, une équipe a démontré la présence majoritaire de *ID1* et *ID3* dans le compartiment mésenchymateux du tube digestif comparativement à *ID2* présent surtout dans le compartiment épithélial (Jen et al., 1996). De plus, l'inhibition de la signalisation des Bmps avec le shARN ou le LDN193189 mène aussi à la diminution significative d'un nouveau gène cible associé à la signalisation des Bmps, soit *ATOH8* (Kautz et al., 2008; Morikawa et al., 2011). On voit aussi de l'antagoniste *GREM1* et des *iSmad*, *Smad6* et *Smad7*, qui sont connus pour être des gènes cibles des Bmps, puisqu'ils permettent d'assurer le contrôle de la rétroinhibition de la voie (Massague et al., 2005).

Les analyses des ARNm des différentes conditions d'inhibition de la signalisation des Bmps démontrent une diminution du récepteur *Bmpr1a* qui est d'une moins grande ampleur que celle des gènes cibles. Ce résultat corrèle avec le fait que seulement une des deux conditions de traitement affecte directement les niveaux du récepteur *Bmpr1a*, soit les shARN dirigé directement contre *Bmpr1a*. Pour le traitement LDN193189, il s'agit d'un antagoniste spécifique qui s'associe aux ligands Bmps afin d'empêcher la signalisation. De cette façon, le traitement au LDN193189 ne cause pas de variations d'expression du récepteur *Bmpr1a*. Ainsi, lorsque l'on combine les deux expériences afin d'augmenter la spécificité et de trouver des gènes cibles de la voie des Bmps, il n'est pas surprenant de voir de moins grandes diminutions de l'ARNm du récepteur *Bmpr1a*. Néanmoins, avec les modulations des gènes cibles obtenues, on peut conclure que la combinaison des deux conditions d'inhibitions de la voie des Bmps permet de voir les effets souhaités en aval de la signalisation. De plus, cette façon de combiner deux traitements différents permet de s'assurer que les nouvelles modifications obtenues seront conséquences à l'inhibition des

Bmps et non à des effets secondaires des traitements. Toutefois, le LDN appliqué sur les 18Co possède une toxicité sur ces cellules après un traitement de 6 heures ce qui limite son utilisation sur une période plus longue. Il serait donc intéressant d'envisager une autre stratégie pour inhiber cette signalisation de façon prolongée. L'utilisation d'un deuxième shARN ciblant le récepteur *Bmpr1a* ou un inhibiteur pharmacologique différent, mais aussi spécifique aux Bmps, pourraient être utilisés afin de valider que les modulations obtenues s'avèrent être réellement des gènes cibles des Bmps. De plus, l'inhibition prolongée de la signalisation des Bmps pourrait aussi permettre de visualiser l'effet à long terme que possède cette inhibition sur les myofibroblaste.

Les analyses effectuées sur les 18Co concernent principalement les niveaux d'ARNm des différents éléments de la voie de signalisation des Bmps. Toutefois, aucune modulation significative des niveaux d'ARNm des effecteurs spécifiques des Bmps, *Smad1*, *Smad5* et *Smad8*, ne fut observée. Ce résultat suggère aucune variation de leur niveau d'expression suite à l'inhibition de la signalisation des Bmps. Dans les deux cas, la phosphorylation de ces mêmes effecteurs, Smad 1, 5 et 8 permettant de voir l'activation de la voie de signalisation des Bmps s'est révélée être grandement diminuée comparativement aux conditions contrôles. Ces résultats démontrent que l'activité de la signalisation des Bmps est significativement inhibée dans les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} confirmant ainsi que les modulations à la baisse des niveaux d'ARNm des différents gènes cibles des Bmps sont réellement causées par une inhibition de l'activité des effecteurs de la voie.

4.3.2 *Les modulations des facteurs de croissance*

Le logiciel IPA permet de faire ressortir les fonctions et maladies auxquelles les variations d'expression d'ARNm dans les conditions analysées correspondent le mieux. Dans ces fonctions biologiques, on retrouve certaines voies de signalisation qui vont être modulées de façon majoritaire. Dans le cas de l'inhibition des Bmps dans les 18Co, certains facteurs de croissance sont modulés comme le HGF et la signalisation du FGF. Le HGF est un facteurs de croissance sécrété par les myofibroblastes et qui va agir principalement sur les cellules épithéliales pour promouvoir leur prolifération et leur régénération (Itoh *et al.*,

2004). Dans le cas où il y a une perte de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes, l'expression de l'ARNm du HGF subit une modulation de près de deux fois à la hausse suggérant que sa sécrétion par les myofibroblastes pourrait être augmentée. Jusqu'à maintenant, les mesures par ELISA de la sécrétion de HGF dans les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} n'ont pas encore été effectuées et devraient être achevées afin de conclure si on observe réellement une modulation de la sécrétion de ce facteur de croissance. Toutefois, ce résultat concorde avec les résultats obtenus dans le volet 2 où les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} possèdent une augmentation de l'ARNm de *HGF* dans les polypes comparativement aux souris contrôles. Dans ces conditions de polypose, la sécrétion et l'activité de la voie du HGF n'ont pas encore été validées. Encore une fois, cela limite les interprétations des conséquences que pourraient avoir le HGF sur les cellules épithéliales dans ces modèles murins et cellulaires. Toutefois, ces résultats permettent d'hypothétiser que l'augmentation du HGF consécutive à la perte des Bmps dans les myofibroblastes peut stimuler la prolifération des cellules épithéliales et permettre l'hyperplasie du tissu retrouvée dans le modèle murin.

La stratégie d'inhiber la signalisation des Bmps en utilisant l'approche shARN et le traitement pharmacologique a permis de voir des modulations des gènes cibles potentiels de cette signalisation. En effet, dans les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189}, certains récepteurs de la signalisation des FGF, soit FGFR3, FGFR4 et FGFR1, possèdent une diminution de leur expression d'ARNm de plus de 2,5 fois. Dans la littérature, il est bien connu que ces ligands sont principalement sécrétés par les cellules épithéliales et ils vont agir sur les cellules avoisinantes soit l'épithélium ou le mésenchyme. Dans ces conditions *in vitro*, seulement le ligand *FGF2* est modulé de façon plus significative comparativement à tous les autres ligands qui ne sont pas modulés. Ce résultat corréle avec une production plus massive des ligands par l'épithélium. Les modulations des ARNm de FGFR3, FGFR4 et FGFR1 suggèrent une moins grande expression protéique de ces récepteurs ainsi qu'une variation de l'activité de cette voie de signalisation de façon intrinsèque au niveau du myofibroblaste, puisque ce sont principalement les récepteurs qui sont affectés. Toutefois, les validations protéiques par analyses en immunobuvardage de niveaux de FGFR et de l'activité de ceux-ci devront être effectuées ultérieurement. Malgré son rôle bien connu

auprès des cellules épithéliales, quelques évidences démontrent que la signalisation des FGF possède un rôle important au niveau du myofibroblaste pour réguler son devenir cellulaire et que ces derniers expriment bien les récepteurs au FGF. Les ligands FGF2 (bFGF) et FGF9 sont les principaux ligands connus comme étant capable d'induire une réponse dans le compartiment mésenchymateux et ils interagissent avec grande affinité aux récepteurs FGFR3 et FGFR4 (Coutu et Galipeau, 2011; Turner, N et Grose, 2010). Chez les myofibroblastes murins embryonnaires, la signalisation FGF promeut, lorsqu'elle est activée par le ligand, la dédifférenciation de ces cellules à l'état de fibroblastes ou de myofibroblastes moins activés associée à une perte de l'expression de l' α SMA (Greenberg *et al.*, 2006; Hauptmann *et al.*, 2003). Ces évidences permettent de suggérer que la perte de signalisation des FGF à la suite de l'inhibition des Bmps peut maintenir les myofibroblastes dans un état activé et renforcer la création d'un mésenchyme réactif. Encore plusieurs expérimentations sont nécessaires afin de valider cette nouvelle hypothèse, les démonstrations *in vitro* que la signalisation du FGF est bien inhibée dans ces conditions pourraient s'effectuer directement sur les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} en regardant l'activation par phosphorylation des récepteurs FGFR3, FGFR4 par des analyses en immunobuvardages. Toutefois, plusieurs résultats permettent d'appuyer cette hypothèse comme les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} possédant un mésenchyme réactif et une augmentation des myofibroblastes activés dans les polypes ainsi que les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} démontrant une diminution des récepteurs de la signalisation du FGF.

4.3.3 Les modulations des cytokines, chimiokines et des éléments de la matrice extra-cellulaire

La majorité des fonctions biologiques qui sont prédites pour être activées dans les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} découle de fonctions associées aux cellules sanguines. En effet, l'activation et le recrutement des cellules sanguines comme les leucocytes et les lymphocytes ont un état d'activation significatif tout comme la fibrose, un état pathologique grandement associé aux myofibroblastes activés (Hinz *et al.*, 2007; Klingberg *et al.*, 2013). Ces prédictions corrélerent aussi avec le phénotype du modèle murin dans

lequel on observe une infiltration massive de cellules immunitaires ainsi que l'augmentation des niveaux d'ARNm des certaines cytokines et chimiokines. De plus, les souris *Bmpr1a*^{ΔMES} démontrent dès les premiers phénotypes une accumulation et une dérégulation d'expression des éléments de la matrice extracellulaire. Ainsi, les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} représentent un excellent modèle pour déterminer des modulations qui sont spécifiques à l'inhibition de la signalisation des Bmps dans la muqueuse colique des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}. Les différents éléments de la matrice extracellulaire, comme les gènes du *COL1A1*, *COL4A5*, *COL5A3* et *COL11A1* sont augmentés de façon significative dans les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} comparativement aux cellules normales. Ces molécules corrélerent avec la fonction de fibrose puisque ce sont des collagènes produits par les myofibroblastes et qui sont dérégulés lors du phénomène de fibrose.

Dans la présente étude, les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} démontrent des modulations à la hausse des niveaux de chimiokines normalement sécrétés dans le milieu extracellulaire soit, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11 et CCL13. En effet, ces différentes chimiokines sont toutes des protéines pouvant être sécrétées par les myofibroblastes activés ou les CAFs (De Boeck *et al.*, 2013; Karagiannis *et al.*, 2012; Polanska et Orimo, 2013; Torres *et al.*, 2013). Leur principale action est de permettre l'attraction de différentes cellules immunitaires, toutefois elles possèdent peu de rôles directs connus sur les myofibroblastes. Les chimiokines, CCL2, CCL7 et CCL11 vont permettre le recrutement de lymphocytes T tandis que les chimiokines CCL8 et CCL13 vont permettre le recrutement des neutrophiles et des macrophages, ce qui pourrait expliquer les différents types de cellules immunitaires retrouvées au niveau de la muqueuse colique des souris *Bmpr1a*^{ΔMES}.

Au niveau des cytokines, les 18Co^{shBmpr1a} et les 18Co^{LDN193189} possèdent des niveaux plus élevés des récepteurs aux interleukines, IL6R et IL1R, sans toutefois avoir des niveaux d'ARNm des cytokines correspondantes modulées. Cette analyse suggère que ce serait la signalisation des cytokines intrinsèque aux myofibroblastes qui seraient modulée plutôt que la sécrétion des cytokines, puisque seulement les récepteurs présents à la membrane sont modulés. Néanmoins, afin de réellement conclure sur cette affirmation, la

capacité de sécrétion des cytokines des myofibroblastes ainsi que l'activation des voies de signalisation intrinsèque correspondantes doivent être vérifiées directement dans ces modèles cellulaires. La sécrétion des cytokines IL6 et IL1 β peuvent être vérifiée par la récolte de milieux conditionnés des 18Co^{shBmpr1a} et des 18Co^{LDN193189}. Pour la signalisation intrinsèque à ces cytokines, il s'agit de vérifier l'activation de leur récepteurs, IL6R et IL1R, par la présence de phosphorylations spécifiques. De plus, la vérification des niveaux d'activation de leurs effecteurs en aval comme MyD88, IRAK et TRAF pour l'IL1 β ainsi que JAK et STAT pour l'IL6 va venir confirmer la signalisation intracellulaire associées à ces cytokines. De plus, si ces récepteurs s'avèrent à être réellement augmentés dans les myofibroblastes ayant perdu la signalisation des Bmps, cela suggère que ces signalisations de cytokines pourraient être responsables de favoriser un phénotype de myofibroblastes activés. En effet, les cytokines IL1 β et IL6 sont connues pour promouvoir une transdifférenciation en myofibroblastes activés et ce autant *in vitro* que *in vivo*.

4.3.4 Volet 3: Conclusions et perspectives

L'utilisation combinée des 18Co^{shBmpr1a} et des 18Co^{LDN193189} a permis de révéler un profil transcriptionnel des myofibroblastes spécifiques à la perte de la signalisation de Bmps qui corrèle avec les modifications de comportements des myofibroblastes et les phénotypes observées dans les souris *Bmpr1a* ^{Δ MES}. En effet, les 18Co inhibés pour la signalisation des Bmps par deux approches indépendantes démontrent une diminution des gènes cibles, une augmentation du HGF et une diminution des récepteurs au FGF sans oublier la grande augmentation d'éléments de la matrice extracellulaire, de cytokines et de chimiokines. Il est donc intéressant de voir que ces résultats supportent en totalité les différents phénotypes retrouvés dans le modèle murin du volet 2.

Afin de poursuivre ce projet, les différentes variations dans l'expression des gènes devraient être validé par l'expression protéique de ces molécules mais aussi par l'activation de la signalisation qu'elles enclenchent. Ces validations effectuées par ELISA ou immunobuvardage chez les 18Co^{shBmpr1a} et des 18Co^{LDN193189} vont permettre de s'assurer

que les conclusions sur le profil transcriptionnel sont belles et bien corrélées avec les résultats de la protéomique et de signalisation intracellulaire de ces cellules. Ainsi, de meilleurs conclusions tant qu'aux mécanismes enclenchés par la perte des Bmps pourraient être portées afin d'aider à mieux comprendre le rôle des Bmps dans le myofibroblastes.

La majorité des modulations observées au niveau du profil transcriptionnel se retrouve principalement au niveau de molécules pouvant être sécrétées dans le milieu extracellulaire pour avoir des effets sur les cellules avoisinantes. Il serait intéressant de faire des expériences de milieu conditionné avec les milieux de culture provenant des 18Co ayant l'inhibition des Bmps. Ce milieu de culture concentré peut être par la suite mis sur des cellules épithéliales ou des cellules immunitaires afin de valider si les modulations dans les 18Co sont suffisantes pour induire des changements drastiques au niveau des autres cellules avoisinantes. Ce type d'expérimentation est l'expérience clé à effectuer dans ce volet, puisqu'elle confirmerait la fonctionnalité et la pertinence biologique des modulations du profil transcriptionnel observé.

Plusieurs récepteurs de FGF, soit FGFR3, FGFR4 et FGFR1, possèdent l'expression de leur gène diminué dans les 18Co^{shBmpr1a} et des 18Co^{LDN193189} suggérant une diminution de cette signalisation au niveau des myofibroblastes. De façon intéressante, des analyses préliminaires bioinformatiques démontrent que la région promotrice de ces gènes contient de nombreuses régions de liaison à l'ADN spécifiques aux effecteurs des Bmps, les BR-Smad soit Smad1 Smad5 et Smad8, mais aussi les régions nécessaires à la liaison de leur co-Smad, Smad4. De plus, les promoteurs des gènes des *FGFR* analysés possèdent de grandes séquences riches en GC, une grande spécificité associée au BR-Smad. C'est pourquoi, il serait intéressant de pousser les analyses informatiques des ces promoteurs, mais aussi d'investiguer la capacité des BR-Smad à lier ces régions promotrices par immunoprécipitation de la chromatine. Ces expériences futures pourraient permettre de mettre en évidence la découverte de nouveaux gènes cibles des Bmps qui pourraient réguler le devenir des myofibroblastes.

L'étude effectuée sur les 18Co^{shBmpr1a} et des 18Co^{LDN193189} a permis de mettre en évidence un modèle cellulaire permettant d'investiguer le mécanisme d'action de la signalisation des Bmps dans les myofibroblastes. Les deux différents traitements effectués sur les 18Co pour inhiber cette signalisation apportent de la spécificité aux modifications de gènes observés et aux conclusions portées. De plus, la majorité des modulations de gènes et de fonctions retrouvés dans ce modèle *in vitro* sont en parallèle avec les phénotypes associés au modèle murin *Bmpr1a*^{ΔMES}. Finalement, l'utilisation future de ces modèles cellulaires va certainement permettre de confirmer les mécanismes d'actions associés au Bmps dans les myofibroblastes, mais aussi d'identifier et de valider de nouveaux gènes cibles de cette voie pouvant être responsables de ces mécanismes.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse pour leur critique scientifique et leurs commentaires constructifs qui m'ont permis d'améliorer grandement la qualité de mes travaux et de ma pensée scientifique. Merci beaucoup au juge externe à l'université, la professeure Marie-Pier Tétreault pour son temps et sa disponibilité. Merci aussi au juge externe du programme, le professeur Mannix Auger-Messier ainsi que la professeure Claire Dubois, la présidente du jury, qui m'ont tous les deux permis d'avoir une vision différente de ma science.

D'une façon très particulière, je tiens à remercier ma directrice de recherche, la professeure Nathalie Perreault, qui a su m'accueillir avec tout ma naïveté et mon émerveillement envers la science et la vie. Elle m'a fait grandir tout en me permettant de rester moi-même et de conserver cette joie de vivre envers la science. Elle m'a transmis la passion et la rigueur scientifique, en plus d'être un modèle de mère de famille ambitieuse pour moi. Nathalie, je te remercie d'avoir été plus qu'une directrice de travaux, tu as été une confidente, une amie et même une deuxième mère.

Je voudrais souligner l'implication et le travail du professeur François Boudreau dans mes divers projets de recherche. Il m'a transmis une grande passion, mais surtout un optimiste à n'en plus finir envers la science biomédicale. Pour lui, les plus petites découvertes sont les plus grandes et les plus innovatrices, ce qui souvent donne un sens à notre travail. Je le remercie sincèrement de m'avoir partagé cette façon positive de voir la science. Je voudrais dire un merci spécial au professeur Fernand-Pierre Gendron qui est toujours présent pour les étudiants et qui pour moi est un modèle de force et de persévérance. Merci d'avoir su me conseiller et me dire les vraies choses lorsque j'en ai eu besoin. Merci aussi à la professeure Nathalie Rivard, qui a fait parti de mon comité d'encadrement et mon examen général. Je la remercie d'avoir su me déstabiliser et me pousser au-delà de mes limites. Ses interventions m'ont fait grandir et m'ont permis d'apprendre à avoir confiance en moi et à toujours foncer.

Je voudrais aussi prendre le temps de remercier tous les membres du département d'anatomie et de biologie cellulaire avec qui j'ai eu le temps de partager de merveilleux moments à travers ces nombreuses années passées aux études supérieures. Merci beaucoup à tous les étudiants, tout le personnel de soutien et tous les professeurs pour votre aide technique et pour vos questionnements scientifiques lors des séminaires ou des discussions. Un merci spécial à la dévouée Suzanne Topping qui a su répondre à toutes mes questions sur les études supérieures et qui possédaient des passions communes aux miennes. Un grand merci aussi à Anne Vézina que j'ai eu un immense plaisir à apprendre à connaître au fil des années pour finalement devenir amies et partager des discussions et des lifts.

Je voudrais remercier les différents collègues que j'ai côtoyés dans le laboratoire de Nathalie. Merci à mon premier assistant de recherche qui a mis à l'épreuve ma naïveté et m'a montré à être quelqu'un de plus fort. Merci à Évelyne Roy et Étienne Lemieux d'autres assistants de recherche qui m'ont supporté dans mes expériences et mes questionnements. Mercis aux étudiants, Sébastien Roy, Sébastien Marcoux, Faiza Maloum, Jessica Gagné-Sansfaçon, de m'avoir endurée à me parler à moi-même sans cesse et d'avoir partager ces nombreuses heures à travailler. Merci aussi aux stagiaires, Marc-Alexandre Emond-Boisjoly, Marc-Antoine Robert, David Abdelahd-Beaulieu, Valérie Émond, avec lesquels j'ai essayé de partager de ma passion, mes connaissances et mes techniques de laboratoire. Je voudrais aussi souligner les membres du laboratoires du professeurs François Boudreau qui ont toujours été là pour partager leur matériel et appareils et qui pour moi faisaient partie intégrale de mon laboratoire de recherche.

Au fil des années, certaines personnes sont devenues plus que des collègues de travail, je me suis fait d'excellents amis qui j'espère le resteront pour la vie. Un merci très spéciale à Faiza Maloum, Evelyne Roy, Stéphanie St-Jean, Christine Jones et Jessica Gagné-Sansfaçon qui ont toujours su être là pour moi et qui m'ont accompagnée dans mes bons et moins bons moments. Je vous adore les filles et je remercie la vie de vous avoir mis sur mon chemin.

Dans un côté moins scientifique, je veux souligner la présence et le soutien de ma famille et mes amis proches qui de façons différentes ont tous participé à mon cheminement scientifique. Un merci plus que particulier à mes parents, Chantal Boissonneault et René Allaire, qui m'ont supporté et m'ont appris à croire à mes rêves. Merci pour votre soutien incessant et votre amour inconditionnel qui me permet d'avancer à chaque jour. Merci à mon frère Jean-Michel Allaire et ma sœur Marie-Renée Allaire d'être comme vous êtes et d'être si fiers de votre grande sœur, grâce à vous j'ai l'impression que je peux accomplir n'importe quoi. Mon frère, je te dois aussi ma persévérance et mon dévouement au travail, tu as tellement travaillé fort dans le passé que tu en es maintenant un exemple pour moi.

Finalement je dédie cette thèse à mon amoureux Patrice Gagnon, qui accompagne ma vie depuis les 15 dernières années et à mon fils Loukas. Patrice, je te remercie de m'accompagner dans tous nos moments, de comprendre ce que c'est être une scientifique sans vraiment le savoir, d'être toujours là pour moi et Loukas et surtout d'accepter que parfois ma science semble plus importante et devient prioritaire. Je n'y serais pas arrivée sans ton soutien, ton aide et ta compréhension. Je te remercie de faire partie de ma vie et d'embellir mes journées. Loukas, tu es ma plus belle réussite. Je te remercie de sacrifier ta maman par moment pour qu'elle réussisse à devenir un docteur. Avec cette thèse, j'espère te montrer à avoir des ambitions, à foncer et à persévérer pour réaliser ce que l'on veut dans la vie. Je te remercie pour le garçon que tu es, pour tes sourires, ta joie de vivre et surtout ton amour.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Agnew BJ, Minamide LS et Bamburg JR. (1995). Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem*, 270(29), 17582-17587.
- Allaire JM, Darsigny M, Marcoux SS, Roy SA, Schmouth JF, Umans L, Zwijsen A, Boudreau F et Perreault N. (2011). Loss of Smad5 leads to the disassembly of the apical junctional complex and increased susceptibility to experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(4), G586-597.
- Anderson JM, Van Itallie CM et Fanning AS. (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*, 16(2), 140-145.
- Andoh A, Bamba S, Brittan M, Fujiyama Y et Wright NA. (2007). Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol Ther*, 114(1), 94-106.
- Arnold SJ, Maretto S, Islam A, Bikoff EK et Robertson EJ. (2006). Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 296(1), 104-118.
- Auclair BA, Benoit YD, Rivard N, Mishina Y et Perreault N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology*, 133(3), 887-896.
- Barker N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 19-33.
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ et Clevers H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457(7229), 608-611.
- Beacham DA et Cukierman E. (2005). Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*, 15(5), 329-341.
- Beck PL, Rosenberg IM, Xavier RJ, Koh T, Wong JF et Podolsky DK. (2003). Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. *Am J Pathol*, 162(2), 597-608.
- Benga G. (2009). Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life*, 61(2), 112-133.

- Beppu H, Mwizerwa ON, Beppu Y, Dattwyler MP, Lauwers GY, Bloch KD et Goldstein AM. (2008). Stromal inactivation of BMPRII leads to colorectal epithelial overgrowth and polyp formation. *Oncogene*, 27(8), 1063-1070.
- Bhowmick NA et Moses HL. (2005). Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*, 15(1), 97-101.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL et Odle J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*, 87, 545-564.
- Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM et Offerhaus GJ. (2011). Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol*, 17(44), 4839-4844.
- Bruewer M, Samarin S et Nusrat A. (2006). Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci*, 1072, 242-252.
- Buller NV, Rosekrans SL, Metcalfe C, Heijmans J, van Dop WA, Fessler E, Jansen M, Ahn C, Vermeulen JL, Westendorp BF, Robanus-Maandag EC, Offerhaus GJ, Medema JP, D'Haens GR, Wildenberg ME, de Sauvage FJ, Muncan V et van den Brink GR. (2015). Stromal Indian hedgehog signaling is required for intestinal adenoma formation in mice. *Gastroenterology*, 148(1), 170-180 e176.
- Chang H, Huylebroeck D, Verschueren K, Guo Q et Matzuk MM. (1999). Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*, 126, 1631-1642.
- Chang H, Huylebroeck D, Verschueren K, Guo Q, Matzuk MM et Zwijsen A. (1999). Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*, 126, 1631-1642.
- Chaplin DD. (2003). 1. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), S442-S459.
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS et Sedergran DJ. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69, 238-249.
- Coulombe G, Leblanc C, Cagnol S, Maloum F, Lemieux E, Perreault N, Feng GS, Boudreau F et Rivard N. (2013). Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Mol Cell Biol*, 33(11), 2275-2284.
- Coutu DL et Galipeau J. (2011). Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*, 3(10), 920-933.
- Crosnier C, Stamatakis D et Lewis J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 7(5), 349-359.

De Boeck A, Hendrix A, Maynard D, Van Bockstal M, Daniels A, Pauwels P, Gespach C, Bracke M et De Wever O. (2013). Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression. *Proteomics*, 13(2), 379-388.

de Lange KM et Barrett JC. (2015). Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J Autoimmun*, 64, 91-100.

de Souza HSP et Fiocchi C. (2015). Immunopathogenesis of IBD : current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepathology*.

Dieleman LA, Elson CO, Tennyson GS et Beagley KW. (1996). Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. *Am J Physiol*, 271(1 Pt 1), G130-136.

Drucilla J. Roberts RLJ, Ann C. Burke, Craig E. Nelson, Bruce A. Morgan, Cliff Tabin. (1995). <Shh is an endodermal signal inducing Bmp4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut.pdf>. *Development*, 121, 3163-3174.

Fiocchi C. (2001). TGF- β /Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 523-526.

Flannigan KL, Geem D, Harusato A et Denning TL. (2015). Intestinal Antigen-Presenting Cells: Key Regulators of Immune Homeostasis and Inflammation. *Am J Pathol*, 185(7), 1809-1819.

Francis PH, Richardson MK, Brickell PM et Tickel C. (1994). Bone morphogenetic protein and a signaling pathway that controls patterning in the developping limb bud. *Development*, 120, 209-218.

Franco OE, Jiang M, Strand DW, Peacock J, Fernandez S, Jackson RS, 2nd, Revelo MP, Bhowmick NA et Hayward SW. (2011). Altered TGF- β signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*, 71(4), 1272-1281.

Francoeur C, Bouatrouss Y, Seltana A, Pinchuk IV, Vachon PH, Powell DW, Sawan B, Seidman EG et Beaulieu JF. (2009). Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 136(1), 268-277 e263.

Fritsch C, Elzbieta A, Swietlicki E, Lefebvre O, Kedinger M, Iordanov H, Levin MS et Rubin DC. (2002). Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest*, 110, 1629-1641.

Gagne-Sansfacon J, Allaire JM, Jones C, Boudreau F et Perreault N. (2014). Loss of Sonic hedgehog leads to alterations in intestinal secretory cell maturation and autophagy. *PLoS One*, 9(6), e98751.

- Gao N, White P et Kaestner KH. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell*, 16(4), 588-599.
- Gerbe F, Legraverend C et Jay P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci*, 69(17), 2907-2917.
- Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS et Condeelis JS. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science*, 304(5671), 743-746.
- Giles RH, van Es JH et Clevers H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1653(1), 1-24.
- Glaire MA, El-Omar EM, Wang TC et Worthley DL. (2012). The mesenchyme in malignancy: a partner in the initiation, progression and dissemination of cancer. *Pharmacol Ther*, 136(2), 131-141.
- Grady WM et Markowitz SD. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3, 101-128.
- Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L et Masur SK. (2006). FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation. *FASEB J*, 20(7), 1006-1008.
- Groschwitz KR et Hogan SP. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 124(1), 3-20; quiz 21-22.
- Gumbiner BM. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 622-634.
- Haegebarth A et Clevers H. (2009). Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol*, 174(3), 715-721.
- Half E, Bercovich D et Rozen P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 22.
- Hanahan D et Weinberg RA. (2000). Hallmark of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan D et Weinberg RA. (2011). Hallmarks of Cancer - The next generation. *Cell*, 144.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkhoeer S, Offerhaus GJ et Clevers H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, 303(5664), 1684-1686.
- Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ et van den Brink GR. (2008). Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nature Reviews*, 8.

- Hartsock A et Nelson WJ. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 660-669.
- Hauptmann S, Siegert A, Berger S, Denkert C, Kobel M, Ott S, Siri A et Borsi L. (2003). Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblast-tumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. *Eur J Cell Biol*, 82(1), 1-8.
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng H, He X, M. WL, Mishina Y et Li L. (2004). Bmp signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-B-catenin signaling. *Nature genetics*, 36(10), 117-1121.
- Hermiston ML et Gordon JI. (1995). In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium - essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology*, 129(2), 489-506.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML et Gabbiani G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170(6), 1807-1816.
- Huang TY, DerMardirossian C et Bokoch GM. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1), 26-31.
- Itoh H, Naganuma S, Takeda N, Miyata S, Uchinokura S, Fukushima T, Uchiyama S, Tanaka H, Nagaike K, Shimomura T, Miyazawa K, Yamada G, Kitamura N, Koono M et Kataoka H. (2004). Regeneration of injured intestinal mucosa is impaired in hepatocyte growth factor activator-deficient mice. *Gastroenterology*, 127(5), 1423-1435.
- Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A et Parkos CA. (2005). Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell*, 16(6), 2636-2650.
- Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA et Nusrat A. (2004). Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell*, 15(6), 2639-2651.
- Ivanov AI, Nusrat A et Parkos CA. (2005). Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays*, 27(4), 356-365.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachami S, Bronson RT et Weinberg RA. (1994). Tumor Spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology*, 4, 1-7.
- Jen Y, Manova K et Benezra R. (1996). Expression Patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 207, 235-252.

- Jobson TM, Bilington CK et Hall IP. (1998). Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest*, 102(12), 2650-2657.
- Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L et Hansson GC. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15064-15069.
- Jones CM, Lyons PM et B.L.M. H. (1991). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in mouse. *Development*, 111, 531-542.
- Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH et Diamandis EP. (2012). Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res*, 10(11), 1403-1418.
- Kaser A, Zeissig S et Blumberg RS. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, 28, 573-621.
- Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaultont S, Mosser J, Coppin H et Roth MP. (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 112(4), 1503-1509.
- Kinzler KW et Vogelstein B. (1998). Landscaping the Cancer terrain. *Science*, 280, 1036-1037.
- Klingberg F, Hinz B et White ES. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*, 229(2), 298-309.
- Koboziev I, Karlsson F et Grisham MB. (2010). Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1207 Suppl 1, E86-93.
- Koliaraki V, Roulis M et Kollias G. (2012). Tpl2 regulates intestinal myofibroblast HGF release to suppress colitis-associated tumorigenesis. *J Clin Invest*, 122(11), 4231-4242.
- Komiya Y et Habas R. (2014). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.
- Kousaka K, Kiyonari H, Oshima N, Nagafuchi A, Shima Y, Chisaka O et Uemura T. (2008). Slingshot-3 dephosphorylates ADF/cofilin but is dispensable for mouse development. *Genesis*, 46(5), 246-255.
- Le Clainche C et Carlier MF. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*, 88(2), 489-513.

- Li X, Madison BB, Zacharias W, Kolterud A, States D et Gumucio DL. (2007). Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol Genomics*, 29(3), 290-301.
- Luna J, Masamunt MC, Lawrance IC et Sans M. (2011). Mesenchymal cell proliferation and programmed cell death: key players in fibrogenesis and new targets for therapeutic intervention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(5), G703-708.
- Lussier C, Basora N, Bouatrouss Y et Beaulieu JF. (2000). Integrins as Mediators of Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Small Intestinal Mucosa. *Microscopy research and technique*, 51, 169-178.
- Lynch HT et Smyrk TC. (1999). Identifying Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 338(21), 1537-1538.
- Madara JL et Carlson SL. (1985). Cup cells: further structural characterization of the brush border and the suggestion that they may serve as an attachment site for an unidentified bacillus in guinea pig ileum. *Gastroenterology*, 89(6), 1384-1386.
- Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT et Gumucio DL. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*, 132(2), 279-289.
- Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E et Gumucio DL. (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*, 277(36), 33275-33283.
- Manichanh C, Borruel N, Casellas F et Guarner F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(10), 599-608.
- Maric I, Poljak L, Zoricic S, Bobinac D, Bosukonda D, Sampath KT et Vukicevic S. (2003). Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats. *J Cell Physiol*, 196(2), 258-264.
- Massagué J. (1998). TGF- β signal transduction. *Annual Review Biochemistry*, 67, 753-791.
- Massague J, Seoane J et Wotton D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19(23), 2783-2810.
- McLin VA, Henning SJ et Jamrich M. (2009). The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 136(7), 2074-2091.
- McReynolds LJ, Gupta S, Figueroa ME, Mullins MC et Evans T. (2007). Smad1 and Smad5 differentially regulate embryonic hematopoiesis. *Blood*, 110(12), 3881-3890.

- Medema JP et Vermeulen L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318-326.
- Meng W et Takeichi M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a002899.
- Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI et Powell DW. (2011). Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(5), G684-696.
- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB et Chen W. (2007). Intestinal M cells - the fallible sentinels. *World J Gastroenterol*, 13(10), 1477-1486.
- Mishina Y, Suzuki A, Ueno N et Behringer RR. (1995). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes and Development*, 9, 3027-3037.
- Monteleone G, Boirivant M, Pallone F et MacDonald TT. (2008). TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol*, 1 Suppl 1, S50-53.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW et MacDonald TT. (2001). Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 601-609.
- Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H et Miyazono K. (2011). ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res*, 39(20), 8712-8727.
- Moser AR, Pitot HC et Dove WF. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*, 247(4940), 322-324.
- Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, Griffiths AM, Ngan BY, Lan H, Xu W, Silverberg MS et Rotin D. (2009). Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut*, 58(8), 1121-1127.
- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ et Lu T. (2014). Genetic pathways, prevention and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400-406.
- Odenwald MA et Turner JR. (2013). Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11(9), 1075-1083.
- Ogata M, Ota Y, Nanno M, Suzuki R et Itoh T. (2014). Activation of intra-epithelial lymphocytes; their morphology, marker expression and ultimate fate. *Cell Tissue Res*, 356(1), 217-230.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y et Nakaya R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.

Organ SL et Tsao MS. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology, suppl 1*, S7-S19.

Ormestad M, Astorga J, Landgren H, Wang T, Johansson BR, Miura N et Carlsson P. (2006). Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. *Development*, 133(5), 833-843.

Otranto M, Sarrazy V, Bonte F, Hinz B, Gabbiani G et Desmouliere A. (2012). The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr*, 6(3), 203-219.

Perreault N et Beaulieu JF. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. . *Exp Cell Res*, 245, 34-42.

Pinchuk IV, Mifflin RC, Saada JI et Powell DW. (2010). Intestinal mesenchymal cells. *Curr Gastroenterol Rep*, 12(5), 310-318.

Polanska UM et Orimo A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J Cell Physiol*, 228(8), 1651-1657.

Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF et Mifflin RC. (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289(1), G2-7.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI et West AB. (1999a). Myofibroblast II - Intestinal subepithelial myofibroblast. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 277, C183-C201.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI et West AB. (1999b). Myofibroblasts I Paracrine cells important in health and disease. *American Physiological Society*, 0363(99), 6143.

Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X et Mifflin RC. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*, 73, 213-237.

Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT et Collins JE. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest*, 85(9), 1139-1162.

Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B et Wang TC. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), 257-272.

Rao JN et Wang JY. (2010). Intestinal Architecture and Development. Dans Sciences, MCL (dir.), *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*.

- Ray RP, Arora K, Nusslein-Volhard C et Gelbart WM. (1991). The control of cell fate along dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development*, 113, 35-54.
- Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J et Rogler G. (2007). Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*, 56(1), 130-139.
- Rieder F et Fiocchi C. (2009). Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(4), 228-235.
- Roberts DJ. (2000). Molecular Mechanism of Development of the Gastrointestinal Tract. *Developmental Dynamics*, 219, 109-120.
- Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ et Tabin CJ. (1998). Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development*, 125, 2791-2801.
- Roy SA, Langlois MJ, Carrier JC, Boudreau F, Rivard N et Perreault N. (2012). Dual regulatory role for phosphatase and tensin homolog in specification of intestinal endocrine cell subtypes. *World J Gastroenterol*, 18(14), 1579-1589.
- Saada JI, Pinchuk IV, Barrera CA, Adegboyega PA, Suarez G, Mifflin RC, Di Mari JF, Reyes VE et Powell DW. (2006). Subepithelial Myofibroblasts are Novel Nonprofessional APCs in the Human Colonic Mucosa. *The Journal of Immunology*, 177(9), 5968-5979.
- Sackett SD, Fulmer JT, Friedman RJ et Kaestner KH. (2007). FoxL1-Cre BABC transgenic mice: a new tool for gene ablation in the gastrointestinal mesenchyme.pdf. *Genesis*, 45, 518-522.
- Saleh M et Trinchieri G. (2011). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 11(1), 9-20.
- Salvarezza SB, Deborde S, Schreiner R, Campagne F, Kessels MM, Qualmann B, Caceres A, Kreitzer G et E. B-R. (2009). LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 20, 438-451.
- Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Phesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, Vass JK, Athineos D, Clevers H et Clarke AR. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature*, 446(7136), 676-679.
- Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M et Clevers H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415-418.
- Schlussel AT, Gagliano RA, Jr., Seto-Donlon S, Eggerding F, Donlon T, Berenberg J et Lynch HT. (2014). The evolution of colorectal cancer genetics-Part 1: from discovery to practice. *J Gastrointest Oncol*, 5(5), 326-335.

Shaker A, Gargus M, Fink J, Binkley J, Darwech I, Swietlicki E, Levin MS et Rubin DC. (2014). Epimorphin(-/-) mice are protected, in part, from acute colitis via decreased interleukin 6 signaling. *Transl Res*, 164(1), 70-83.

Shaker A, Swietlicki EA, Wang L, Jiang S, Onal B, Bala S, DeSchryver K, Newberry R, Levin MS et Rubin DC. (2010). Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *J Clin Invest*, 120(6), 2081-2093.

Shroyer NF, Wallis D, Venken KJT, Bellen HJ et Zoghbi HY. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes and Development*, 19, 2412-2417.

Stappenbeck TS. (2010). The role of autophagy in Paneth cell differentiation and secretion. *Mucosal Immunol*, 3(1), 8-10.

Sturm A et Dignass AU. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 14(3), 348-353.

Taddei ML, Giannoni E, Comito G et Chiarugi P. (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett*, 341(1), 80-96.

Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S et Tsukita S. (2008). Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology*, 134(2), 523-534.

Thompson JC, Saxena SK et Sharp JG. (2000). Regulation of intestinal regeneration. *Microscopy research and technique*, 51, 129-137.

Torres S, Bartolome RA, Mendes M, Barderas R, Fernandez-Acenero MJ, Pelaez-Garcia A, Pena C, Lopez-Lucendo M, Villar-Vazquez R, de Herreros AG, Bonilla F et Casal JJ. (2013). Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 19(21), 6006-6019.

Tremblay KD, Dunn NR et Roberston EJ. (2001). Mouse embryo lacking Smad1 displays defect in extra-embryonic tissues. *Development*(128), 3609-3621.

Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, Thompson JC, Caserta E, Wang H, Chong JL, Naidu S, Wei G, Sharma SM, Stephens JA, Fernandez SA, Gurcan MN, Weinstein MB, Barsky SH, Yee L, Rosol TJ, Stromberg PC, Robinson ML, Pepin F, Hallett M, Park M, Ostrowski MC et Leone G. (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature*, 461(7267), 1084-1091.

Turner JR. (2000). 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol*, 11(4), 301-308.

- Turner JR. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(11), 799-809.
- Turner N et Grose R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(2), 116-129.
- Vaheri A, Enzerink A, Rasanen K et Salmenpera P. (2009). Nemo-sis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Exp Cell Res*, 315(10), 1633-1638.
- Valentich JD, Popov V, Saada JI et Powell DW. (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *American Journal Physiology*, 272(41), C1513-C1524.
- van den Brink GR. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*, 87(4), 1343-1375.
- van der Flier LG et Clevers H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 71, 241-260.
- van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM et Clevers H. (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*, 7(4), 381-386.
- Wang Y, Wang L, Iordanov H, Swietlicki EA, Zheng Q, Jiang S, Tang Y, Levin MS et Rubin DC. (2006). Epimorphin(-/-) mice have increased intestinal growth, decreased susceptibility to dextran sodium sulfate colitis, and impaired spermatogenesis. *J Clin Invest*, 116(6), 1535-1546.
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE et Giancotti FG. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*, 87, 733-743.
- Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K et Shinomura Y. (2014). Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol*, 49(2), 270-282.
- Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT et Turner JR. (2008). Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*, 88(10), 1110-1120.
- Wen Z, Han L, Bamberg JR, Shim S, Ming GL et Zheng JQ. (2007). BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J Cell Biol*, 178(1), 107-119.

Westbrook AM, Szakmary A et Schiestl RH. (2010). Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. *Mutat Res*, 705(1), 40-59.

White ES, Baralle FE et Muro AF. (2008). New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol*, 216(1), 1-14.

Worthley DL, Si Y, Quante M, Churchill M, Mukherjee S et Wang TC. (2013). Bone marrow cells as precursors of the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 319(11), 1650-1656.

Xavier RJ et Podolsky DK. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.

Xu CJ, Mikami T, Nakamura T, Tsuruta T, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX et Okayasu I. (2013). Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: the roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor. *Pathol Res Pract*, 209(2), 69-74.

Zbuk KM et Eng C. (2007). Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 4(9), 492-502.

Zorn AM et Wells JM. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 221-251.

ANNEXES

Annexe 1 : Licence pour l'utilisation des figures 1 et 2.

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2015

This is a License Agreement between Joannie Allaire ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|--|---|
| License Number | 3760830600326 |
| License date | Dec 02, 2015 |
| Licensed content publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed content publication | Nature |
| Licensed content title | Wnt signalling in stem cells and cancer |
| Licensed content author | Tannishtha Reya and Hans Clevers |
| Licensed content date | Apr 14, 2005 |
| Volume number | 434 |
| Issue number | 7035 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 2 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 2 Tissue anatomy of the adult small intestine. Figure 3 Tissue anatomy of the colonic epithelium. |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | None |
| Title of your thesis / dissertation | L'implication de la signalisation des Brmps dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale/colique et dans les pathologies du tractus gastro-intestinal |
| Expected completion date | Feb 2016 |
| Estimated size (number of pages) | 200 |
| Total | 0.00 CAD |
| Terms and Conditions | |

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this

Annexe 2 : Licence pour l'utilisation de la figure 3.



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer

Author: James C. Hardwick, Liudmila L. Kodach, G. Johan Offerhaus and Gijs R. van den Brink

Publication: Nature Reviews Cancer

Publisher: Nature Publishing Group

Date: Aug 29, 2008

Copyright © 2008, Rights Managed by Nature Publishing Group

Logged in as:
Joannie Allaire
Account #:
3000979622

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Joannie Allaire ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

| | |
|--|---|
| License Number | 3763270403917 |
| License date | Dec 06, 2015 |
| Licensed content publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed content publication | Nature Reviews Cancer |
| Licensed content title | Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer |
| Licensed content author | James C. Hardwick, Liudmila L. Kodach, G. Johan Offerhaus and Gijs R. van den Brink |
| Licensed content date | Aug 29, 2008 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Volume number | 8 |
| Issue number | 10 |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | FIGURE 1 Bone morphogenetic protein (BMP) pathway signalling. |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | None |
| Title of your thesis / dissertation | L'implication de la signalisation des Brmps dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale/colique et dans les pathologies du tractus gastro-intestinal |
| Expected completion date | Feb 2016 |
| Estimated size (number of pages) | 200 |
| Total | 0.00 CAD |

[ORDER MORE...](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2015 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com